

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE *IN VITRO* DES ANOMALIES IMMUNITAIRES INDUITES  
PAR LE VIRUS DE L'ANÉMIE AVIAIRE (CAV)

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE  
LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR  
MARIA LUCIANA POGGI-TRINIDAD  
FÉVRIER 2006

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier tout d'abord mon mari Gabriel Soumis-Dugas, ma mère Susana Trinidad et ma belle-mère Nicole Soumis pour leur énorme et apprécié appui. Ces gens m'ont apporté un soutien à tous les niveaux durant ce travail et c'est grâce à cela que j'ai pu me concentrer à faire la présente étude. Je veux aussi dire un grand merci à ma fille Kamilia Poggi-Dugas qui a su se comporter avec autonomie et sagesse durant tous ces moments où je n'ai pu être disponible.

Maintenant, je voudrais souligner ma reconnaissance face à ma directrice de recherche Dr. Lamontagne qui m'a soutenue tout au long de ma maîtrise et qui m'a conseillé toujours au mieux de ses connaissances. Je voudrais également remercier mon co-directeur Dr. Archambault qui m'a accueilli dans son laboratoire en me fournissant toute l'aide technique nécessaire. Je veux aussi faire part de ma considération pour l'appui financier effectué par CORPAQ qui m'a permis tout comme à plusieurs autres étudiants de continuer mes études sans endettement.

Finalement, il est aussi important de remercier les assistants de recherche Christian Bleau et Marie-Claude Saint-Louis ainsi que mes collègues de laboratoire Alexandre Jacques, Alexia Monges et Chantale Auger pour leur appui technique et moral. Un grand merci aussi à tous ceux qui ont su croire en moi. Merci à vous tous.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xviii
LISTE DES SYMBOLES.....	xx
RÉSUMÉ.....	xxi
INTRODUCTION.....	1

### CHAPITRE 1: ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 La famille des Circoviridae.....	4
1.1.1 Le circovirus porcin.....	4
1.1.2 Le virus de la maladie du bec et des plumes.....	5
1.1.3 Le virus de l'anémie aviaire (CAV).....	6
1.1.4 La structure et la réplication des circovirus.....	6
1.1.4.1 Caractéristiques virologiques .....	7
1.1.4.2 Les différentes souches du CAV.....	8
1.1.4.3 Les cellules utilisées pour la production du CAV.....	9
1.1.4.4 Détection du CAV chez les poulets infectés.....	10
1.2 La maladie induite par le CAV.....	10
1.2.1 La transmission de la maladie.....	10
1.2.2 Les signes cliniques.....	11
1.2.3 Les lésions histopathologiques.....	12
1.2.4 L'immunodéficience induite par le CAV.....	12
1.2.4.1 Les macrophages et cellules présentatrices d'antigènes.....	14

1.2.4.2 Les lymphocytes T.....	15
1.2.4.3 Les lymphocytes B.....	17
1.2.4.4 L'effet de l'infection par le CAV sur la production des cytokines.....	18
1.2.4.5 L'effet de l'infection sur la réponse des cellules aux stimulations par la ConA et la PHA.....	20
1.2.5 Les vaccins.....	20
1.3 L'apoptose.....	21
1.4 L'immunologie aviaire.....	23
1.4.1 La colonisation des organes lymphoïdes durant l'embryogenèse.....	23
1.4.2 Les organes lymphoïdes primaires et secondaires.....	24
1.4.3 Les cellules immunes.....	26
1.4.3.1 Les cellules présentatrices d'antigène.....	26
1.4.3.2 Les cellules NK.....	28
1.4.3.3 Les lymphocytes T.....	28
1.4.3.4 Les lymphocytes B.....	29
1.4.4 Les cytokines aviaires.....	31
1.4.5 La stimulation du système immunitaire aviaire par le LPS et les lectines.....	34
1.5 Hypothèses.....	36

## CHAPITRE 2: MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Virus et cellules.....	37
2.1.1 Oiseaux.....	37

2.1.2 Virus.....	37
2.1.3 Cellules.....	37
2.1.3.1. Les cellules MDCC-CU147.....	37
2.1.3.2 Cellules immunitaires.....	38
2.1.4 Infections virales et titrages.....	39
2.1.4.1 Infections des cellules MDCC-CU147.....	39
2.1.4.2 Infections virales des cellules lymphoïdes ou myéloïdes et des macrophages.....	40
2.1.4.3 Détection d'ADN viral par PCR.....	41
2.2 Techniques d'analyses des divers paramètres immunologiques des cellules lymphoïdes et des macrophages myéloïdes.....	42
2.2.1 Immunomarquages des différentes sous-populations lymphocytaires.....	42
2.2.2 Détection d'apoptose et de nécrose par un simple ou un double immunomarquage TUNEL/Annexine V.....	43
2.2.3 Évaluation fonctionnelle des lymphocytes.....	45
2.2.4. Activité phagocytaire des macrophages.....	45
2.2.5 Détection des cytokines.....	46
2.2.6 Analyses statistiques.....	47

## CHAPITRE 3: RÉSULTATS

3.1. Effets <i>in vitro</i> du Virus CAV sur les cellules du thymus de poussins.....	48
3.1.1. Poussins SPF de 1jr .....	48
3.1.1.1. Apoptose causée par le CAV .....	48
3.1.1.2. Analyse phénotypique des sous-populations thymiques .....	51

3.1.1.2.1. Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD4/CD8 infectées par les virus CUX-1 et CIA-1 .....	51
3.1.1.2.2. Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD3/CD8 infectées par les virus CUX-1 et CIA-1.....	57
3.1.1.2.3. Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD3/TCR $\gamma\delta$ infectées par les virus CUX-1 et CIA-1.....	60
3.1.2. Poussins SPF âgés de 7jr.....	63
3.1.2.1. Apoptose causée par le CAV .....	63
3.1.2.2. Analyse phénotypique des sous-populations thymiques .....	69
3.1.2.2.1. Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD4/CD8 infectées par les virus CUX-1 et CIA-1.....	69
3.1.2.2.2. Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD3/CD8 infectées par les virus CUX-1 et CIA-1.....	73
3.1.2.2.3. Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD3/TCR $\gamma\delta$ infectées par les virus CUX-1 et CIA-1.....	76
3.1.3. Poussins commerciaux de 1jr.....	79
3.1.3.1. Apoptose causée par le CAV .....	79
3.1.3.2. Analyse phénotypique des sous-populations thymiques .....	82
3.1.3.2.1. Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD4/CD8 infectées par les virus CUX-1 et CIA-1.....	82

3.1.4. Comparaison des sous-populations CD4/CD8 chez des thymocytes de poussins de 1jr SPF et commerciaux.....	86
3.1.5. Détection de l'ADN viral dans les thymocytes aviaires infectés codant pour la protéine VP3 du CAV.....	88
3.2. Effets <i>in vitro</i> du virus CAV sur les cellules de rate de poussins .....	90
3.2.1. Poussins SPF âgés d'un jour.....	90
3.2.1.1. Analyse phénotypique des sous-populations CD4/CD8 de splénocytes infectées par les virus CUX-1 et CIA-1.....	90
3.2.2. Poussins SPF âgés de 7jours.....	93
3.2.2.1. Apoptose causée par le CAV .....	93
3.2.2.2. Analyse phénotypique des sous-populations spléniques .....	99
3.2.2.2.1. Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD4/CD8 infectées par les virus CUX-1 et CIA-1.....	99
3.2.2.2.2. Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD3/CD8 infectées par les virus CUX-1 et le CIA-1.....	102
3.2.2.2.3. Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires spléniques IgM/TCR $\gamma\delta$ infectées par les virus CUX-1 et le CIA-1 .....	105
3.2.3. Détection de l'ADN viral dans les lymphocytes spléniques infectés codant pour la protéine VP3 du CAV.....	108
3.3. Effets <i>in vitro</i> du virus CAV sur les cellules lymphoïdes et myéloïdes de moelle osseuse de poussins SPF .....	110
3.3.1. Poussins SPF d'un jour d'âge.....	110
3.3.1.1. Apoptose des cellules de moelle osseuse causée par le CAV .....	110



3.3.1.2. Analyse phénotypique des sous-populations IgM/Ia des cellules de moelle osseuse infectées par le virus CUX-1.....	111
3.3.1.3. Analyse phénotypique des sous-populations IgM/CD45 des cellules de moelle osseuse infectées par le virus CUX-1.....	116
3.3.2. Poussins SPF âgés de 7jr.....	120
3.3.2.1. Apoptose des cellules de moelle osseuse causée par le CAV .....	120
3.3.2.2. Analyse phénotypique des sous-populations IgM/Ia des cellules de moelle osseuse infectées par les virus CUX-1 et CIA-1.....	126
3.3.2.3. Analyse phénotypique des sous-populations IgM/CD45 des cellules de moelle osseuse infectées par les virus CUX-1 et CIA-1.....	129
3.3.3. Détection de l'ADN viral dans les cellules de moelle osseuse aviaires infectées codant pour la protéine VP3 du CAV.....	132
3.4. Effets <i>in vitro</i> des virus CAV sur la phagocytose par les cellules de moelle osseuse de poussins d'un jour.....	134
3.5. Effets <i>in vitro</i> du virus CAV sur la transformation blastique des cellules du thymus chez les poussins SPF d'un jour et de la rate chez les poussins SPF de 7 jours.....	139
3.6. Effets <i>in vitro</i> du CAV sur la sécrétion de cytokines (INF- $\gamma$ et TGF- $\beta$ 1) par les cellules de thymus, de la rate et de la moelle osseuse.....	143
CHAPITRE 4: DISCUSSION	
4.1 L'induction d'apoptose lors des infections <i>in vitro</i> par les souches CUX-1 et CIA-1 du CAV.....	147

4.2 Les effets de l'infection <i>in vitro</i> par le CAV sur les sous-populations cellulaires selon les marqueurs CD4/CD8 dans les organes lymphoïdes de jeunes poussins.....	152
4.3 Les effets de l'infection <i>in vitro</i> par le CAV sur les sous-populations cellulaires selon les marqueurs TCR dans les organes lymphoïdes de jeunes poussins.....	157
4.4 Les effets de l'infection <i>in vitro</i> par le CAV sur les cellules myéloïdes en culture.....	158
4.5 La présence de la VP3 dans les cultures de cellules infectées <i>in vitro</i> avec les virus CAV.....	160
4.6 Le dérèglement de l'immunomodulation par l'infection <i>in vitro</i> des cellules d'organes lymphoïdes de poussins par le CAV.....	161
4.7 Processus pathogéniques des infections avec la souche virulente CUX-1 et la souche atténuée CIA-1.....	165
CONCLUSION.....	169
RÉFÉRENCES.....	171

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : (A) Analyse FSC/SSC des thymocytes de poussins SPF de 1jr après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii) comparée aux cellules contrôles (i) et (B) pourcentages des cellules TUNEL positives dans la région sélectionnée.
- Figure 2: Pourcentages des thymocytes TUNEL+ de poussins SPF de 1jr après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 et CIA-1 comparés aux cellules contrôles.
- Figure 3 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par le virus CUX-1 (ii) et analyse phénotypique des différentes sous populations CD4/CD8 (B) pour les thymocytes normaux R2 (i et ii) et apoptotiques R1 (iii et iv), non-infectées (i et iii) et infectés (ii et iv).
- Figure 4 : Pourcentages des différentes sous-populations thymiques CD4/CD8 non-infectées et infectées par le virus CUX-1, localisées dans les régions R1 (a) et R2 (b).
- Figure 5 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées avec le virus CIA-1 (ii) et analyse phénotypique des différentes sous populations CD4/CD8 (B) pour les thymocytes normaux R2 (i et ii) et apoptotiques R1 (iii et iv) non-infectées (i et iii) et infectés (ii et iv).
- Figure 6 : Pourcentages des différentes sous-populations thymiques CD4/CD8 non-infectées et infectés par le CIA-1, localisées dans les régions R1 (a) et R2 (b).
- Figure 7 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches virales CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), et analyse phénotypique des différentes sous populations CD3/CD8 (B) pour les thymocytes normaux R2 (i, ii et iii) et apoptotiques R1 (iv, v et vi), non-infectées (i et iv) ou infectés par le CUX-1 (ii et v) et par le CIA-1 (iii et vi).
- Figure 8 : Pourcentages des différentes sous-populations CD3/CD8 pour les thymocytes non-infectés et infectés par les virus CUX-1 et CIA-1 et localisés dans les régions R1 (a) et R2 (b).

- Figure 9 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), et analyse phénotypique des différentes sous populations CD3/TCR $\gamma\delta$  (B) pour les thymocytes normaux R3 (i, ii et iii) et apoptotiques R1 (iv, v et vi) non-infectées (i et iv) ou infectés par le CUX-1 (ii et v) et par le CIA-1 (iii et vi).
- Figure 10 : Pourcentages des différentes sous-populations CD3/TCR $\gamma\delta$  pour les thymocytes non-infectés et infectés par les virus CUX-1 et CIA-1 localisés dans les régions R1 (a) et R2 (b).
- Figure 11 : Analyse FSC/SSC (A) des thymocytes de poussins SPF de 7jrs après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii) comparées aux cellules non-infectées (i) et pourcentages des cellules TUNEL positives dans la région sélectionnée (B).
- Figure 12 : Pourcentages des thymocytes TUNEL+ de poussins SPF 7jrs après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 et CIA-1 comparés aux non-infectés.
- Figure 13 : Analyse FSC/SSC (A) des thymocytes de poussins SPF 7jr après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii) comparés à des cellules non-infectées et analyse multiparamétrique des populations ANNEXIN V/ Iodure de Propidium (B) pour les cellules des régions R2 (i, ii et iii), R3 (iv, v et vi) et R1 (vii, viii et ix) chez des cellules non-infectées (i, iv et vii), ou infectées avec les virus CUX-1 (ii, v et viii) et CIA-1 (iii, vi et ix).
- Figure 14 : Pourcentages des différentes sous-populations ANNEXIN V/Iodure de Propidium pour les thymocytes non-infectés et infectés par les virus CUX-1 et CIA-1 localisés dans la région R1 (a), R2 (b) et R3 (c).
- Figure 15 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), et analyse phénotypique (B) des différentes sous populations CD4/CD8 pour les thymocytes normaux R2 (i, ii et iii) et apoptotiques R1 (iv, v et vi), non-infectées (i et iv) et infectés par le CUX-1 (ii et v) ou le CIA-1 (iii et vi).
- Figure 16 : Pourcentages des différentes sous-populations CD4/CD8 (A) pour les thymocytes témoins et infectés par les virus CUX-1 et CIA-1 apoptotiques (R1) (a) et normaux (R2) (b) et, intensité du marqueur CD8 (B) chez des thymocytes normaux (a) et apoptotiques (b).

- Figure 17 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), et analyse phénotypique des différentes sous populations CD3/CD8 (B) pour les thymocytes normaux R2 (i, ii et iii) et apoptotiques R1 (iv, v et vi), non-infectées (i et iv) et infectés par les virus CUX-1 (ii et v) ou le CIA-1 (iii et vi).
- Figure 18 : Pourcentages des différentes sous-populations CD3/CD8 pour les thymocytes témoins et infectés par les virus CUX-1 et CIA-1 apoptotiques (a) et normaux (b).
- Figure 19 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), et analyse phénotypique des différentes sous populations CD3/TCR $\gamma\delta$  (B) pour les thymocytes normaux R2 (i, ii et iii) et apoptotiques R1 (iv, v et vi) non-infectées (i et iv) et infectés par les virus CUX-1 (ii et v) ou le CIA-1 (iii et vi).
- Figure 20 : Pourcentages des différentes sous-populations CD3/TCR $\gamma\delta$  chez les thymocytes apoptotiques (a) et normaux (b), non-infectés et infectés par les virus CUX-1 ou CIA-1.
- Figure 21 : Analyse FSC/SSC (A) des régions de cellules de thymocytes de poussins commerciaux 1jr après 72hrs d'infection *in vitro* avec le surnageant cellulaire (i), les virus CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii) et analyse phénotypique en pourcentages des populations ANNEXIN V/ Iodure de Propidium (B) pour les cellules normales (R2) (i, ii et iii), (R3) (iv, v et vi) et apoptotiques (R1) (vii, viii et vix) chez des cellules non-infectées (i, iv et vii) et infectées par les virus CUX-1 (ii, v et viii) ou CIA-1 (iii, vi et ix).
- Figure 22 : Pourcentages des sous-populations ANNEXIN V/Iodure de Propidium pour les thymocytes non-infectés et infectés par les virus CUX-1 ou CIA-1, apoptotiques (R1) (a) et normaux (R2) (b) et (R3) (c).
- Figure 23 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), et analyse phénotypique des différentes sous populations CD4/CD8 (B) pour les thymocytes normaux R2 (i, ii et iii) et apoptotiques R1 (iv, v et vi), non-infectées (i et iv) et infectés par les virus CUX-1 (ii et v) ou CIA-1 (iii et vi).

- Figure 24 : Pourcentages des différentes sous-populations CD4/CD8 pour les thymocytes témoins et infectés par les virus CUX-1 et CIA-1 apoptotiques (R1) (a) et normaux (R2) (b).
- Figure 25 : Pourcentages des sous-populations CD4/CD8 entre les thymocytes de poussins d'un jour SPF et commerciaux ayant été infectés par les souches virales CUX-1 (A) ou CIA-1 (B) pour la région apoptotique (R1) (a) et non-apoptotique (R2) (b).
- Figure 26 : Détection de l'ADN viral (protéine VP3) dans les surnageants provenant des thymocytes de poussins SPF 1jr (A), 7jrs (B) et commerciaux 1jr (C), incubés 24 heures avec le surnageant contrôle (MDCC), la souche CUX-1 et la souche CIA-1, lavés à deux reprises avec du RPMI (SVF 20%) et reincubés pour une période de 48heures. Résultats représentatifs de trois expériences similaires.
- Figure 27 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), et analyse phénotypique des différentes sous populations CD4/CD8 (B) pour les lymphocytes de rate normaux R2 (i, ii et iii) et apoptotiques R1 (iv, v et vi), non-infectées (i et iv) ou infectés par les virus CUX-1 (ii et v) et CIA-1 (iii et vi).
- Figure 28 : Analyse FSC/SSC (A) des lymphocytes de rate de poussins SPF de 7jrs après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii) comparées aux cellules non-infectées (i) et pourcentages des cellules TUNEL positives dans la région sélectionnée (B).
- Figure 29 : Pourcentages des lymphocytes de rate de poussins SPF de 7jrs TUNEL+ après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 et CIA-1 comparés aux non-infectés.
- Figure 30 : Analyse FSC/SSC (A) des lymphocytes de rate de poussins SPF 7jrs après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii) comparés à des cellules non-infectées (i) et analyse multiparamétrique des populations Annexin V/ Iodure de Propidium (B) pour les cellules des régions R2 (i, ii et iii) et R1 (iv, v et vi) chez des cellules non-infectées (i et iv), ou infectées avec les virus CUX-1 (ii et v) et CIA-1 (iii et vi).
- Figure 31 : Pourcentages des différentes sous-populations Annexin V/Iodure de Propidium pour les lymphocytes de rate témoins et infectés par les

virus CUX-1 et CIA-1 dans les régions R1 (FSC/SSC faibles) (a) et R2 (FSC/SSC normaux) (b).

- Figure 32 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), et analyse phénotypique des différentes sous populations CD4/CD8 (B) pour les lymphocytes de rate normaux R2 (i, ii et iii) et apoptotiques R1 (iv, v et vi), non-infectées (i et iv) ou infectés par le CUX-1 (ii et v) et par le CIA-1 (iii et vi).
- Figure 33 : Pourcentages des différentes sous-populations CD4/CD8 pour les lymphocytes de rate témoins et infectés par les virus CUX-1 et CIA-1 dans les régions R1 (FSC/SSC faibles) (a) et R2 (FSC/SSC normaux) (b).
- Figure 34 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), et analyse phénotypique des différentes sous populations CD3/CD8 (B) pour les lymphocytes de rate normaux R2 (i, ii et iii) et apoptotiques R1 (iv, v et vi), non-infectées (i et iv) et infectés par le virus CUX-1 (ii et v) ou le CIA-1 (iii et vi).
- Figure 35 : Pourcentages des différentes sous-populations CD3/CD8 pour les lymphocytes de rate témoins et infectés par les virus CUX-1 et CIA-1 dans les régions R1 (FSC/SSC faibles) (a) et R2 (FSC/SSC normaux) (b).
- Figure 36 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), analyse phénotypique des différentes sous populations IgM/TCR $\gamma\delta$  de la région R1 (B) non-infectées (i) et infectés par le virus CUX-1 (ii) ou le CIA-1 (iii) et analyse de la région R5 des figures de B en deux sous-régions (R5 et R7) (C).
- Figure 37 : Pourcentages des différentes sous-populations IgM/TCR $\gamma\delta$  pour les lymphocytes de rate témoins et infectés par les virus CUX-1 et CIA-1 ; section à 3 régions donnée par les régions R4 (IgM+TCR $\gamma\delta$ -) et R5 (IgM-TCR $\gamma\delta$ +) (a) et section à 4 régions donnée par les régions R5 (IgM-TCR $\gamma\delta$ lo) et R7 (IgM-TCR $\gamma\delta$ hi) (b).
- Figure 38 : Détection de l'ADN viral (protéine VP3) dans les surnageants provenant des lymphocytes de rate de poussins SPF d'un jour (puits :1,

2, 3 et 4) et de 7 jrs (puits 5, 6, 7 et 8), incubés 24heures avec le surnageant contrôle (MDCC), la souche CUX-1 et la souche CIA-1, lavés à deux reprises avec du RPMI (SVF 20%) et reincubés pour une période de 48heures. Les surnageants ont alors été congelés à -80C jusqu'à l'extraction de l'ADN. Résultats représentatifs de trois expériences similaires.

- Figure 39 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules de moelle osseuse de poussins SPF d'un jour après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii) comparées aux cellules non-infectées (i) et pourcentages des cellules TUNEL positives dans la région sélectionnée (B).
- Figure 40 : Pourcentages des cellules de moelle osseuse TUNEL+ de poussins SPF d'un jour après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 et CIA-1 comparés aux cellules non-infectés.
- Figure 41 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par la souche CUX-1 (ii), et analyse phénotypique des différentes sous populations IgM/Ia (B) pour les cellules de moelle osseuse des régions R2 (i et ii), R3 (iii et iv) et R1 (v et vi), non-infectées (i, iii et v) ou infectés par le CUX-1 (ii, iv et vi).
- Figure 42 : Pourcentages des différentes sous-populations IgM/Ia pour les cellules de moelle osseuse non-infectées et infectés par le virus CUX-1 dans les régions (R1) (a), (R2) (b) et (R3) (c).
- Figure 43 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par la souche CUX-1 (ii), et analyse phénotypique des différentes sous populations IgM/CD45 (B) pour les cellules de moelle osseuse normaux R2 (i et ii), R3 (iii et iv) et apoptotiques R1 (v et vi), non-infectées (i, iii et v) ou infectés par le CUX-1 (ii, iv et vi).
- Figure 44 : Pourcentages des différentes sous-populations IgM/CD45 pour les cellules de moelle osseuse témoins et infectés par le virus CUX-1 dans les régions (R1) (a), (R2) (b) et (R3) (c).
- Figure 45 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules de moelle osseuse de poussins SPF 7jrs après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii) comparées aux cellules non-infectées (i) et pourcentages des cellules TUNEL positives dans la région sélectionnée (B).



- Figure 46 : Pourcentages des cellules de moelle osseuse TUNEL+ de poussins SPF 7jrs après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 et CIA-1 comparés aux cellules non-infectées.
- Figure 47 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules de moelle osseuse de poussins SPF 7jrs après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii) comparés à des cellules non-infectées (i), et analyse multiparamétrique des populations ANNEXIN V/ Iodure de Propidium (B) pour les cellules des régions R2 (i, ii et iii) et R1 (iv, v et vi) en provenance de cellules non-infectées (i et iv), ou infectées avec les virus CUX-1 (ii et v) et CIA-1 (iii et vi).
- Figure 48 : Pourcentages des différentes sous-populations ANNEXIN V/Iodure de Propidium pour les cellules de moelle osseuse non-infectées et infectées par les virus CUX-1 et CIA-1 dans les régions R1 (a) et R2 (b).
- Figure 49 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), et analyse phénotypique des différentes sous populations IgM/Ia (B) pour les cellules de moelle osseuse normales R2 (i, ii et iii) et apoptotiques R1 (iv, v et vi), non-infectées (i et iv) ou infectés par les virus CUX-1 (ii et v) ou CIA-1 (iii et vi).
- Figure 50 : Pourcentages des différentes sous-populations IgM/Ia pour les cellules de moelle osseuse non-infectées et infectées par les virus CUX-1 ou le CIA-1, dans les régions R1 (a) et R2 (b).
- Figure 51 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), et analyse phénotypique des différentes sous populations IgM/CD45 (B) pour les cellules de moelle osseuse normales R2 (i, ii et iii) et apoptotiques R1 (iv, v et vi), non-infectées (i et iv) ou infectés par les virus CUX-1 (ii et v) ou CIA-1 (iii et vi).
- Figure 52 : Pourcentages des différentes sous-populations IgM/CD45 pour les cellules de moelle osseuse non-infectées et infectés par les virus CUX-1 ou CIA-1, dans les régions R1 (a) et R2 (b).
- Figure 53 : Détection de l'ADN viral (protéine VP3) dans les surnageants provenant de cellules de moelle osseuse de poussins SPF 1jr (A) et

7jrs (B), incubées 24heures avec le surnageant contrôle (MDCC), la souche CUX-1 et la souche CIA-1, lavées à deux reprises avec du RPMI (SVF 20%) et réincubées pour une période de 48heures. Les surnageants ont alors été congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'extraction de l'ADN. Résultats représentatifs de trois expériences similaires.

- Figure 54 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules de moelle osseuse de poussins commerciaux d'un jour non-stimulées après 72 heures d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii) et intensité de la fluorescence (B) des cellules ayant phagocyté 1 bille (M1), 2 billes (M2) et 3 billes et plus (M3) provenant de la région R1 (i, ii et iii) et de la région R2 (iv, v et vi) contrôles (i et iv), infectées par les virus CUX-1 (ii et v) ou CIA-1 (iii et vi).
- Figure 55 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules de moelle osseuse de poussins commerciaux d'un jour stimulées avec du LPS après 72 heures d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii) et intensité de la fluorescence (B) des cellules ayant phagocyté 1 bille (M1), 2 billes (M2) et 3 billes et plus (M3) provenant de la région R1 (i, ii et iii) et de la région R2 (iv, v et vi) contrôles (i et iv), infectées par les virus CUX-1 (ii et v) ou CIA-1 (iii et vi).
- Figure 56 : Pourcentages des cellules ayant phagocyté une bille (M1), deux billes (M2) et trois billes et plus (M3) ayant été stimulées ou non avec du LPS et infectées avec les virus CIA-1 ou CUX-1 et comparées au contrôle.
- Figure 57 : Stimulation blastique en des thymocytes de poussins SPF d'un jour en culture, non-infectés et infectés avec les virus CIA-1 ou le CUX-1 en absence (A) ou en présence de  $30\mu\text{g/ml}$  de ConA (B).
- Figure 58 : Stimulation blastique des lymphocytes de rate de poussins SPF de 7jours en culture non-infectés et infectés avec les virus CIA-1 ou le CUX-1 en absence (A) ou en présence de  $30\mu\text{g/ml}$  de ConA (B).
- Figure 59 : Quantité de l'INF- $\gamma$  aviaire produite par des thymocytes de poussins SPF 1 et 7 jrs après 72heures d'infection avec les virus CIA-1 ou CUX-1.
- Figure 60 : Quantité d'INF- $\gamma$  aviaire produite par des lymphocytes de rate de poussins SPF 1 et 7 jrs après 24heures d'infection avec les virus CIA-1 ou le CUX-1.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN:	Acide desoxyribonucléique
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
BSA:	Albumine de sérum bovin
CAV :	Chicken anemia virus
CD :	Cluster of differentiation
CO <sub>2</sub> :	Dioxyde de Carbone
CIA-1:	Souche virale atténuée de CAV
ConA :	Concanavaline A
cMGF :	Facteur de croissance myélomonocytaire de poulet
CMH I :	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMH II :	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CSF :	Facteur de stimulation de colonies
CUX-1 :	Souche virale virulente de CAV
CU147 :	Lignée cellulaire MDCC ayant subi 147 passages
ELISA :	Enzyme-linked immunosorbent assay
FITC :	Fluorescéine
FSC :	Forwardscatter
GM-CSF :	Granulocytes macrophages - facteur de stimulation de colonies
IFN- $\gamma$ :	Interféron-gamma
Ig :	Immunoglobuline
IL-:	Interleukine
LPS :	Lipopolysaccharide
MDCC :	Marek's Disease Cells
MTS/PMS :	Phénazine méthosulfate/3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophényl)-2H tétrazolium
ORF :	Open reading frame (cadres de lecture ouverts)
PBFDV:	Circovirus des psittacidés et les oiseaux à plumes
PBS :	Phosphate buffer saline
PCR :	Polymerase chain reaction
PCV:	Circovirus Porcin
PCV1:	Circovirus Porcin de type 1
PCV2:	Circovirus Porcin de type 2
PE :	Phycoérythrine
PHA :	Phytohémaglutinine A
PK15 :	Lignée cellulaire de rein de porc
SDPS:	Syndrome de dépérissement post-sévrage
SPF :	Specific pathogen free
SSC :	Side scatter

SVF :	Sérum de veau foetal
Tc :	Cellule T cytotoxique
TCID <sub>50</sub> :	Tissue culture infectious dose <sub>50</sub>
TCR :	T cell receptor (récepteur de cellule T)
TGFβ :	Facteur de croissance des cellules T beta
Th :	Cellule T auxilaire
TNFα:	Facteur de nécrose tumorale alpha
TNFβ :	Facteur de nécrose tumorale beta
TUNEL :	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d'UTP-nick and labeling

## LISTE DES SYMBOLES

g/cm<sup>3</sup>

g/ml

ng/ml

ml

μl

μm

nm

mM

Kb

pb

KDa

°C

pH

rpm

## RÉSUMÉ

Le virus de l'anémie aviaire (CAV) est un virus à ADN simple brin de la famille des *Circoviridae* qui cause une immunodéficience ainsi qu'une anémie et des hémorragies chez les poulets. Ce virus cause un déséquilibre chez les populations lymphocytaires affectées telles que les cellules T CD8<sup>+</sup> (principalement), CD4<sup>+</sup>, les macrophages, les lymphocytes B ainsi que les cellules précurseurs des lymphocytes T et les hémocytoblastes (hématopoïétiques). Le CAV entraîne également des dysfonctions immunitaires qui se manifestent par une diminution de la phagocytose chez les macrophages et par la modification de la sécrétion de certaines cytokines comme l'augmentation de l'INF $\gamma$  et la diminution du TCGF, de l'IL-1 et de l'IL-6. L'objectif de cette recherche était de démontrer que le CAV peut affecter *in vitro* les populations lymphocytaires principalement les cellules précurseurs des lymphocytes T. Nous avons également voulu observer si les diminutions des populations lymphocytaires suite à l'apoptose étaient causées par le CAV. Ainsi, des cellules provenant d'organes lymphoïdes (moelle osseuse, thymus et rate) ont été infectées *in vitro* par deux souches de CAV soit la souche pathogène CUX-1 et la souche atténuée CIA-1 et leur phénotype analysé par des double-immunomarquages (CD4, CD8, TCR, CD3, CD45, IgM). Aussi, les capacités fonctionnelles de lymphocytes de la rate et du thymus infectés ont été évaluées par la transformation blastique en présence de ConA. La phagocytose des macrophages de moelle osseuse infectés a été vérifiée à l'aide de billes fluorescentes et la sécrétion de cytokines a été quantifiée par des tests ELISA. L'apoptose des cellules a été mesurée par des tests TUNEL et ANNEXIN V/IP. La présence de l'ADN viral codant pour l'apoptine VP3 a été détectée par PCR. Cette étude a été effectuée chez des cellules provenant de poussins à 1 et 7 jours post-éclosion afin de déterminer si la maturation lymphocytaire durant les premiers jours post-éclosion avait un impact sur la défense contre le CAV. Nos résultats ont montré que la différence de pathogénicité des deux souches du CAV était liée au niveau de l'apoptose précoce et tardive des cellules myéloïdes en culture et des thymocytes induite par l'infection virale. Aussi, nous avons observé que les cellules précurseurs, qui étaient les plus affectées par ces virus, ne possédaient pas le TCR- $\gamma\delta$  mais exprimaient fortement au moins les marqueurs CD3 et CD8. Nous avons également constaté des baisses fonctionnelles des thymocytes surtout avec la souche pathogène CUX-1. Les lymphocytes spléniques CD8<sup>+</sup> étaient aussi affectés par l'infection virale. Par contre, les capacités phagocytaires des macrophages myéloïdes étaient augmentées en présence des virus. Les effets des virus étaient plus évidents chez les poussins de 7jrs d'âge ou commerciaux d'un jour. Les cellules TCR- $\gamma\delta$  et les lymphocytes B n'étaient pas affectés par les infections virales. Les conséquences de l'infection virale et de l'apoptose induite par le virus sur l'efficacité de la réponse immune chez le jeune poussin dépendent autant de la souche virale que de la nature de ou des sous-populations de cellules-cibles lymphoïdes ou myéloblastiques et du niveau de maturité immunologique du poussin.

## INTRODUCTION

Le virus de l'anémie aviaire (CAV) a été identifié au Japon, en 1979, suite à l'apparition de mortalités chez les poulets ayant présenté des symptômes tels que l'anémie, la lymphopénie, des hémorragies dans différents tissus ainsi que des lésions hépatiques (Yuasa *et al.* 1979; McNulty 1991). Cette maladie a été observée principalement chez les jeunes poussins en développement (jusqu'à 10 jours après l'éclosion) entraînant une immunodéficience et réduisant ainsi les défenses de l'organisme face à des infections par d'autres pathogènes (McNulty 1991).

Le CAV a un diamètre de 25 nm et contient dans sa capside icosaédrique un ADN circulaire simple brin de 2,3 Kb (Todd *et al.* 1990). Il appartient à la famille des *Circoviridae* et au genre *Gyrovirus* (Todd 2000). Cependant, la nature de la cellule-cible du CAV n'est pas très bien connue. Il semble que ce virus puisse infecter les hémocytoblastes de la moëlle osseuse qui sont les cellules précurseurs des érythrocytes, des granulocytes et des thrombocytes (Smyth *et al.* 1993) ce qui se traduit par une anémie et une diminution du nombre de leucocytes en circulation (Taniguchi *et al.* 1982; 1983). Le virus entraîne aussi la destruction des cellules myéloïdes de la moëlle osseuse qui sont responsables de la lignée monocyttaire/macrophagique, ce qui a pour effet d'affecter les fonctions des macrophages (McConnell *et al.* 1993a). Le virus infecte également les cellules précurseurs des lymphocytes T du cortex thymique (Adair *et al.* 1993) ce qui entraîne l'atrophie du thymus. Par contre, les cellules B et leurs précurseurs ne sont pas susceptibles à l'infection puisque la diminution des lymphocytes B demeure faible comparativement à celle des lymphocytes T du cortex thymique (Taniguchi *et al.* 1983; Jeurissen *et al.* 1989).

Le CAV entraîne *in vivo* des dérèglements dans les processus immunitaires, tel que démontré par l'infection *in vivo* de poussins où la capacité de réponse



blastogénique des lymphocytes de la rate à des mitogènes ainsi que la production d'interleukines (IL) étaient diminuées (Adair *et al.* 1991; Otaki *et al.* 1988). Cette infection cause également *in vivo* une diminution de la production de l'IL-1 par les macrophages de rate ainsi qu'une réduction de l'expression du récepteur Fc à leur surface, de la phagocytose et de l'activité microbicide (McConnell *et al.* 1993a; McConnell *et al.* 1993b).

Très peu d'informations sont disponibles sur les mécanismes par lesquels le CAV induit l'immunodéficience chez le poussin. Les connaissances sur la nature des cellules-cibles et les déséquilibres immunitaires découlent des études réalisées chez des poussins malades ou infectés expérimentalement. Comme plusieurs facteurs peuvent influencer l'évolution d'une infection virale *in vivo*, il est nécessaire de développer un modèle *in vitro* d'infection afin de différencier les effets immunosuppresseurs induits directement par la réplication virale dans des cellules-cibles présumées et les effets indirects résultant de déséquilibres fonctionnels des cellules infectées. Ainsi, il est possible que l'infection de cellules myéloïdes et thymiques précurseurs entraîne soit la mort par apoptose de ces cellules privant ainsi l'oiseau de sa capacité à générer des cellules lymphocytaires matures ou soit une infection virale abortive pouvant entraîner une diminution des facteurs de croissance essentiels à la maturation des lymphocytes.

La susceptibilité des cellules myéloïdes et lymphocytaires à l'infection par le CAV pourrait expliquer l'état d'immunodéficience des poussins et leur plus grande susceptibilité à des infections virales et bactériennes, ce qui entraîne des pertes économiques autant chez les poules pondeuses que chez le poulet de chair (McIlroy *et al.* 1992). Le CAV, de par son éventail d'effets potentiels sur le système immunitaire, devient un modèle d'étude original pour la compréhension des interactions entre la réplication virale dans les cellules cibles et l'apoptose subséquente et les mécanismes de défense de l'hôte (Adair 2000).



Dans le cadre de ce travail de recherche, nous avons voulu vérifier la permissivité *in vitro* des sous-populations lymphocytaires provenant de différents organes lymphoïdes de jeunes poussins afin de déterminer les mécanismes responsables des désordres cellulaires, tels qu'observés *in vivo*. Grâce à cette approche *in vitro*, il a été possible d'identifier des anomalies fonctionnelles et cellulaires causées par l'infection virale favorisant une immunodéficience chez les poulets. Un accent particulier a été mis sur l'induction d'apoptose, sous le contrôle de la réplication virale, pouvant affecter certaines sous-populations lymphocytaires.

# CHAPITRE 1

## ÉTAT DES CONNAISSANCES

### 1.1 La famille des *Circoviridae*

La famille des *Circoviridae* inclut trois membres, dont le CAV (Yuasa *et al.* 1979), le circovirus porcin (PCV) (Tischer *et al.* 1982) et le circovirus des psittacidés et les oiseaux à plumes (PBFDV : Psittacine Beak Feather Disease Virus) (Pass et Perry 1984). Les circovirus possèdent certaines caractéristiques biophysiques et biochimiques communes qui leur donnent la propriété d'avoir une très forte résistance à la dégradation par l'environnement, ce qui a des répercussions évidentes au point de vue épidémiologique (Todd 2000). La détermination des séquences de nucléotides entre ces trois circovirus a montré une très faible homologie entre eux (Todd *et al.* 1990). C'est en se basant sur ces différences moléculaires que le Congrès International de Virologie à Sydney, en 1999, a décrété que le CAV serait le seul membre d'un nouveau genre, le *Gyrovirus*, le différenciant des autres circovirus appartenant au genre *Circovirus*, quoique les deux genres continueraient à appartenir à la même famille des *Circoviridae* (Todd 2000).

#### 1.1.1 Le circovirus porcin

Le circovirus porcin (PCV) a été isolé pour la première fois en Allemagne en 1974, d'une lignée cellulaire de rein de porc (PK15) qui était infectée de manière persistante (Tischer *et al.* 1982). Ce virus non-enveloppé de 17nm de diamètre contient un génome composé d'ADN circulaire simple brin (Hamel *et al.* 1998; Niagro *et al.* 1998). Il existe deux types de PCV, soit le circovirus porcin de type 1 (PCV1) et de type 2 (PCV2). C'est le virus type 1 (PCV1) qui a été isolé de la lignée cellulaire PK15 (Dulac et Afshar 1989). Ce virus n'est pas considéré comme un

pathogène pour les porcs (Allan *et al.* 1995; Tischer *et al.* 1986). Par contre, le PCV2 est considéré comme l'agent responsable du syndrome de dépérissement post-sevrage (SDPS), du syndrome de la dermatite néphrotique porcine, de tumeurs congénitales et de problèmes reproducteurs (Allan *et al.* 1998; Gresham *et al.* 2000; Meehan *et al.* 2001; Rosell *et al.* 2000). Selon les études de Chen *et al.* (2002) certaines caractéristiques communes peuvent être détectées chez les porcs. Ainsi, les porcs affectés ont démontré une perte de poids, de la dyspnée et de la jaunisse. De plus, les lésions observées incluent la lymphadénopathie, les pneumonies interstitielles, l'hépatite et la néphrite interstitielle. Les lésions histopathologiques incluent l'infiltration macrophagique, la perte lymphocytaire, la formation d'un nombre variable de syncytiums dans les tissus lymphoïdes et la présence caractéristique des inclusions cytoplasmiques basophiliques chez les macrophages. Les deux types de virus possèdent deux régions majeures de lecture (Open Reading Frames : ORF), l'ORF1 et l'ORF2. L'ORF1 code pour la protéine associée à la réplication (Mankertz *et al.* 1998) tandis que l'ORF2 code pour les protéines structurales de la capsid virale (Nawagitgul *et al.* 2000). Les séquences différant entre PCV1 et PCV2 sont principalement situées dans l'ORF2 (Choi *et al.* 2002; Hamel *et al.* 1998; Mankertz *et al.* 1998). Aussi, le PCV2 peut se distinguer du PCV1 par des séquences dans son génome et son antigénicité (Allan *et al.* 1998; Gresham *et al.* 2000; Hamel *et al.* 1998; Mahe *et al.* 2000).

### **1.1.2 Le virus de la maladie du bec et des plumes**

Le PBFDV a été détecté pour la première fois vers 1974 chez des psittacidés du sud du pacifique (Pass et Perry 1984). Ce virus non-enveloppé icosaédrique d'un diamètre de 14-17nm, contient un ADN circulaire simple brin de 2.3Kb (Bassami *et al.* 2001; Niagro *et al.* 1998; Ritchie *et al.* 1989) . Ce virus cause chez ces oiseaux une dystrophie symétrique et progressive des plumes ainsi qu'une déformation du bec (Ritchie *et al.* 1989; Pass et Perry 1984). La dystrophie des plumes est due à la

nécrose et à l'hyperplasie des cellules de l'épiderme (Pass et Perry 1984). Des examens histopathologiques ont révélé des corps d'inclusions basophiliques intranucléaires et intracytoplasmiques dans les cellules épithéliales des plumes et chez les macrophages (Jacobson *et al.* 1986; Pass et Perry 1984). De plus, il a été possible d'observer une atrophie et des agrégats focalisés de nécrose dans les tissus lymphoïdes du thymus et de la bourse de Fabricius (Studdert 1993). Par contre, les symptômes cliniques ne sont pas responsables de la mort de ces oiseaux, ce sont plutôt les infections secondaires causées par l'immunosuppression engendrée par le PBFDV qui sont mortelles (Ritchie *et al.* 1989).

### **1.1.3 Le virus de l'anémie aviaire (CAV)**

Le virus de l'anémie aviaire (CAV) a été isolé pour la première fois au Japon en 1979 et a été associé à une maladie caractérisée par de l'anémie et une perte sévère des lymphocytes des organes lymphoïdes primaires et secondaires (Yuasa *et al.* 1979; Taniguchi *et al.* 1982; 1983). Ce virus de diamètre de 25nm, est composé d'une capside ayant 32 unités morphologiquement creuses (Todd *et al.* 1990). Le CAV a une densité de 1,35 à 1,36g/cm<sup>3</sup> dans le CsCl. Il résiste à des températures de 80°C durant 15min ainsi qu'à des traitements au chloroforme et à l'éther (Yuasa *et al.* 1979). Le CAV a un génome d'ADN simple brin circulaire de 2,31Kb codant pour trois protéines VP1, VP2 et VP3 (McNulty 1991). Le CAV infecte non seulement les poulets, mais peut aussi se répliquer *in vitro* chez des cellules de lignée lymphoblastoïdes aviaires.

### **1.1.4 La structure et la réplication des circovirus**

Les circovirus ont été reconnus comme les plus petits virus infectant des animaux et autant au niveau du diamètre du virion que de la longueur du génome. Ils

sont aussi les seuls virus infectant des animaux ayant un ADN circulaire simple brin (Studdert 1993). Ainsi, généralement, les circovirus ont un génome composé d'ADN négatif, simple brin et circulaire fermé par un lien covalent. La quantité de nucléotides peut varier de 1,76Kb (PCV) à 2,31Kb (CAV) (Todd *et al.* 1990). Le génome possède probablement seulement un seul promoteur et une séquence signal poly A (Claessens *et al.* 1991). La protéine composant la capsid protéique du virus chez le porc (PCV) est de 30 kDa tandis que chez le CAV elle est de 50kDa. Les virus résistent bien à des températures élevées de 60°C pour une période de 30min et ont une densité dans le CsCl de 1,34g/ml (Studdert 1993). Cependant, il n'y a pas de déterminant antigénique commun ni de séquences homologues d'ADN communes chez ces trois virus (PCV, PBFDV et CAV) (Todd *et al.* 1990). La réplication virale a lieu dans le noyau de la cellule et comme la réplication des parvovirus, elle dépend des protéines cellulaires produites durant la phase S du cycle cellulaire. La présence d'ADN circulaire double brin, soit la forme répllicative d'ADN intermédiaire, a été démontrée chez des cellules infectées (Claessens *et al.* 1991).

#### 1.1.4.1 Caractéristiques virologiques

Le génome du CAV comprend trois régions codant pour différentes protéines et par conséquent un ARNm polycistronique polyadénylé qui comprend les trois cadres de lecture ouverts (CLO) qui se superposent partiellement ou complètement (Douglas *et al.* 1995) donnant ainsi les trois protéines : VP1(51,6kDa), VP 2 (24,0kDa) et VP3 (13,3kDa) (Norteborn *et al.* 1994). La protéine de la capsid VP1 contient un résidu agissant comme déterminant de la pathogénicité (Yamaguchi *et al.* 2001). Il a été démontré, par Renshaw *et al.* (1996), que la région hypervariable de la VP1 du CAV était impliquée dans le taux de la réplication virale ainsi que dans le tropisme cellulaire *in vitro*. La protéine VP2 aide au repliement de la VP1 durant l'assemblage de la capsid (Norteborn et Koch 1995) alors que la VP3 induit l'apoptose dans les

cellules infectées (Noteborn *et al.* 1994), mais par une voie indépendante de la p53 (Zhuang *et al.* 1995a). En fait, le stress cellulaire qu'il soit génotoxique, oxydatif ou causé par des protéines virales, il induit l'expression de la p53. Cette protéine agit sur des séquences d'AND spécifiques en activant les protéines p21 WAF/CIP et Bax qui sont impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire. La perte de la fonction de p53 peut permettre la survie inappropriée de cellules endommagées et déclencher ainsi la formation de tumeurs.

La protéine VP3 ou apoptine, est composée de 121 acides aminés contenant deux extensions riches en proline et deux régions basiques (Noteborn *et al.* 1991). La présence de la VP3 semble importante dans le cycle viral selon les études de Noteborn *et al.* (1994), tel que démontré avec des virus CAV ayant des délétions sur la protéine VP3. De plus, lors de la transcription du génome viral, il a été possible de détecter faiblement la présence d'ARNm viraux spécifiques après 8 heures et fortement après 32 heures d'infection (Noteborn *et al.* 1992; Phenix *et al.* 1994). Lors de la réplication virale, la production des protéines VP2 et VP3 apparaît très tôt dans le cycle de l'infection, environ 12 heures post-infection, et elles sont présentes en grand nombre dans les noyaux des cellules infectées (Douglas *et al.* 1995).

#### **1.1.4.2 Les différentes souches du CAV**

Le CAV possède plusieurs souches différentes qui varient de par leur pathogénicité, leur durée de réplication et leur tropisme cellulaire. La première souche de CAV qui a été isolée, la souche CUX-1, sert de prototype pour les études sur le CAV. Il existe différentes variantes de l'isolat CUX-1 provenant de l'Allemagne soit le CUX N (Noteborn *et al.* 1991), le CUX M (Meehan *et al.* 1992) et le Cux 10 (Meehan *et al.* 1997). Les isolats CIA-1 (Soiné *et al.* 1994) et 26P4 (Claessens *et al.* 1991) proviennent des Etats-Unis. Les isolats CAA 82-2 (Kato *et al.* 1995) et TK-5803 (Farkas *et al.* 1996) sont issues du Japon. Il a été démontré par Renshaw *et al.*

(1996) que la souche CUX-1, plus virulente que la souche CIA-1, possède une région de 316pb qui contrôle le taux de réplication et le tropisme.

#### 1.1.4.3 Les cellules utilisées pour la production du CAV

Les recherches de Calnek *et al.* (1999) ont démontré que certaines lignées cellulaires présentant des phénotypes particuliers sont plus sensibles à l'infection par les virus CUX-1 et/ou CIA-1 et ainsi la vitesse de réplication et de diffusion diffère d'un type cellulaire à l'autre. Les cellules actuellement utilisées pour la production *in vitro* du CAV proviennent d'une lignée de cellules lymphoblastoïdes de poulet (MDCC) modifiées par le virus de la maladie de Marek, soit un herpesvirus (Cui *et al.* 2004). Il existe une grande variété de lignées MDCC, mais les plus utilisées pour la production des souches CUX-1 et CIA-1 sont principalement les cellules CU147 et MSB1 (Akiyama et Kato 1974). Il a été établi que les cellules MSB1 possèdent des caractéristiques des lymphocytes T matures, car elles sont de phénotype : CD3+, CD4+, CD8-, TCR2( $\alpha\beta_1$ )<sup>+</sup> (Adair *et al.* 1993). Les cellules CU147 expriment par contre, le phénotype :CD3+, CD4-, CD8+, TCR3( $\alpha\beta_2$ )<sup>+</sup> (Calnek *et al.* 1999). Cependant, même s'il a été difficile pour Calnek *et al.* (1999) d'établir des relations entre les phénotypes des lignées de cellules permissives à la réplication virale, il existe des différences dans la sensibilité à la souche CUX-1. En fait, les cellules de lignées CD4-CD8<sup>+</sup> étaient plus permissives de façon significative, que les cellules de lignées CD4+CD8- ou CD4-CD8-. Par contre, aucune différence de permissivité pour les souches CUX-1 et CIA-1 n'a été détectée entre les cellules de lignées de phénotype TCR2<sup>+</sup> et TCR3<sup>+</sup>. Toutefois, une des lignées CD4-CD8<sup>+</sup>, soit la CU147 est apparue comme la plus susceptible à l'infection par la souche CUX-1.

#### **1.1.4.4 Détection du CAV chez les poulets infectés**

Il existe plusieurs façons de détecter la présence du CAV chez les poulets infectés. Le virus peut être isolé après culture d'échantillons cliniques sur cellules lymphoblastoïdes MDCC-MSB1 (Yuasa *et al.* 1983), ou par inoculation du virus chez des poulets d'un jour ne possédant pas d'anticorps contre le CAV et d'apparition subséquente des symptômes associés à la pathologie tel que l'anémie (Yuasa *et al.* 1983). Cependant, ces procédures sont coûteuses et consomment trop de temps (McNeilly *et al.* 1991). L'équipe de McNeilly *et al.* (1991) ont mis au point une méthode permettant de détecter les antigènes du CAV par immunoperoxydase ou par immunofluorescence. Ils ont montré la présence d'antigènes dans le thymus, particulièrement dans le cortex, et aussi dans la moëlle osseuse, chez des poussins de 5 à 9 jours après l'infection. Cependant, ces techniques ne sont pas aussi sensibles que la détection par réaction en chaîne par la polymérase (PCR) (Soiné *et al.* 1993). Cette dernière technique est très sensible et a permis de détecter la présence du CAV dans plusieurs autres organes lymphoïdes primaires et secondaires, ainsi que dans le foie et dans les organes reproducteurs (Cardona *et al.* 2000).

### **1.2 La maladie induite par le CAV**

#### **1.2.1 La transmission de la maladie**

Le CAV est une maladie spécifique aux poulets, car il a été impossible de détecter des anticorps et/ou signes cliniques chez des canards et dindons (McNulty *et al.* 1988). Plusieurs études ont montré le développement d'anticorps chez des poulets d'élevage (Yuasa *et al.* 1980, 1985; Bülow 1988; McNulty *et al.* 1988; Rosenberg et Cloud 1989a; Lucio *et al.* 1990) mais aussi la présence d'anticorps anti-CAV chez des poulets exempts d'agents pathogènes spécifiques (SPF) (Yuasa *et al.* 1980, 1985; Bülow 1988; McNulty *et al.* 1989; Nicholas *et al.* 1989).



Chez les poulets les infections peuvent être transmises de manière verticale (Yuasa et Yoshida 1983) par les oeufs, ainsi qu'horizontale (Yuasa *et al.* 1979, 1980; Rosenberg et Cloud 1989b), ce qui implique que le virus peut autant infecter les jeunes poussins que les poulets adultes. Les poulets développent une résistance à la maladie induite par le CAV entre 7 et 14 jours d'âge, et l'infection demeure à un état sub-clinique. Par contre, les anticorps maternels contre le CAV, s'ils sont présents, peuvent fournir une protection contre la maladie chez le poussin, mais pas contre la replication virale et la transmission à d'autres poulets dans l'élevage (Studdent 1993).

### **1.2.2 Les signes cliniques**

Les premiers signes de la maladie apparaissent généralement vers la fin de la deuxième semaine de vie du poulet. Chez les jeunes poussins, l'infection causée par le CAV se traduit de façon générale par une anémie sévère, une atrophie du thymus et un jaunissement de la moëlle osseuse qui sont responsables de la mort de l'oiseau (Goryo *et al.* 1985; Otaki *et al.* 1987; Taniguchi *et al.* 1982; Yuasa *et al.* 1979; Yuasa et Imai 1986). L'oiseau semble alors anorexique et dépressif, ses plumes ont un aspect hérissé et tombent facilement et sa crête devient pâle (McNulty 1991). Les oiseaux affectés démontrent également des lésions localisées de la peau qui surgissent généralement sur les ailes mais peuvent aussi être présentes sur la tête, autour du croupion, aux côtés du thorax, sur l'abdomen, sur les cuisses, les pattes et les pieds. Ces lésions semblent être dues à des hémorragies ecchymotiques de la peau. La peau devient bleue et craque en libérant des exsudats sérosanguinolents. Ces lésions prédisposent ainsi à des infections bactériennes secondaires pouvant amener une dermatite gangreneuse. La mortalité de l'oiseau survient habituellement de 5 à 6 jours après le début des signes cliniques, s'ils se manifestent (Engstrom et Luthman 1984)

### 1.2.3 Les lésions histopathologiques

Il a été constaté, de 4 à 6 jours après le début de l'infection, une diminution des érythrocytes matures et des cellules hématopoïétiques suivie de l'apparition de larges cellules blastiques. La moëlle osseuse devient hypoplasique et même aplasique et les tissus hématopoïétiques sont remplacés par du tissu adipeux. Autant l'érythropoïèse que la myélopoïèse sont affectés par l'infection virale (McNulty 1991).

Les principaux changements histopathologiques dans le thymus, la rate, la bourse de Fabricius et les amygdales caecales se caractérisent par une perte de lymphocytes et une hyperplasie des cellules réticulaires. Les lymphocytes corticaux du thymus disparaissent et sont remplacés par des cellules réticulaires. Les lymphocytes médullaires diminuent également en nombre (McNulty 1991). Par contre, la diminution de lymphocytes dans la rate et de la bourse se produit entre 4 à 6 jours après l'apparition des lésions du thymus et de la moëlle osseuse (Taniguchi *et al.* 1983). Après 20 jours d'infection, le thymus amorce une repopulation lymphocytaire. Il a aussi été constaté dans le foie, lors de la phase aiguë de la maladie de l'anémie aviaire, un gonflement des hépatocytes (Goryo *et al.* 1989).

### 1.2.4 L'immunodéficience induite par le CAV

Le CAV est considéré comme un virus causant de l'immunodéficience, ce qui a une incidence sur les infections secondaires opportunistes. Cette immunodéficience se traduit par une baisse des cellules du système immunitaire telles que les lymphocytes CD3+CD4+ (T auxiliaires), CD8+ (T cytotoxiques) ainsi que les cellules NK (Bounous *et al.* 1995). Une diminution fonctionnelle des macrophages a aussi été observée (McConnell *et al.* 1993a). Aussi la diminution des cytokines IL-4, IL-6 et IL-8 produites normalement par les cellules T CD4+ suite à l'infection par le CAV entraîne une dysfonction des lymphocytes B et, par conséquent, une diminution

de la production d'anticorps (Von Bulow et Schat 1997; Box *et al.* 1988; De Boer *et al.* 1994). Ces dérèglements peuvent résulter de la destruction des thymocytes *in vivo* et des cellules lymphoblastoïdes *in vitro* par le phénomène d'apoptose (Jeurissen *et al.* 1992a) causé par la protéine virale VP3 qui se retrouve dans les structures apoptotiques des cellules infectées par le CAV et mortes par apoptose (Noteborn *et Koch* 1995; Noteborn *et al.* 1994; Danen Van Oorschot *et al.* 1997).

La baisse des cellules B et la production d'anticorps ne serait pas due à l'infection de ces cellules par le virus, mais plutôt au manque de production et de sécrétion des cytokines nécessaires à leur stimulation. La destruction des populations effectrices par le CAV a pour effet de modifier le réseau de cytokines, ce qui peut expliquer l'atrophie de la bourse de Fabricius (Adair 2000).

Aussi, le CAV tend à infecter les cellules précurseurs qui sont à la base de la production des cellules du système immunitaire. L'activité hématopoïétique de la moëlle osseuse est contrôlée par une large éventail de cytokines produites par les cellules stromales, les macrophages et cellules T (Nicola 1989). Une diminution de la production de ces cytokines par ces cellules suite à l'infection par le CAV pourrait aussi entraîner indirectement une immunodéficience en diminuant le nombre de lymphocytes matures (Adair 2000).

Il a été constaté, après l'infection *in vivo* de poulets à différents âges, que les cellules infectées étaient retrouvées dans le thymus et la moëlle osseuse. Aucune cellule infectée n'a été détectée dans le foie, la rate, la bourse de Fabricius et amygdales caecales. Il a été conclu que les cellules infectées par le CAV provenaient du thymus et de la moëlle osseuse et qu'elles étaient responsables de la dissémination systémique du virus aux autres organes-cibles (Hopp et Reece 1991). Récemment, des études immunohistochimiques de la moëlle osseuse et des tissus lymphoïdes des oiseaux montrent que les cellules permissives au CAV sont les hémocytoblastes.

Dans le thymus, par contre, ce sont les cellules T précurseurs qui semblent être la cible principale du CAV, car elles sont particulièrement susceptibles au virus (Adair 2000). En fait, la perte de cellules T est moins importante dans les organes lymphoïdes secondaires que dans le thymus, ce qui indique une destruction préférentielle des cellules précurseurs ou des lymphocytes T immatures soit les  $CD4^+CD8^+$ . Aussi, ces cellules sont celles qui sont sélectivement infectées par le virus dans le thymus (Adair *et al.* 1993).

Cependant, il existe très peu d'études concernant les infections *in vitro*. La première étude a été effectuée en 1994 par McNeilly *et al.* Dans cette recherche il a été démontré que les cellules mononucléaires de la rate et de la moëlle osseuse présentaient des antigènes de CAV. Par contre, les cellules mononucléaires dérivant du thymus ne contenaient pas d'antigènes CAV. Les auteurs ont suggéré que la faible viabilité des thymocytes *in vitro* serait responsable de leur incapacité à supporter la réplication virale.

#### **1.2.4.1 Les macrophages et cellules présentatrices d'antigènes**

L'infection par le CAV des cellules hématopoïétiques et/ou des progéniteurs myéloïdes qui sont à la source des monocytes/macrophages, aurait un effet sur les fonctions des macrophages (McConnell *et al.* 1993a). Ainsi, il a été montré que les macrophages provenant de poulets infectés au CAV produisaient moins d'IL-1, une interleukine essentielle dans le développement de la réponse inflammatoire. De plus, une baisse de l'expression du récepteur Fc et de l'activité phagocytaire a été remarquée chez les macrophages de la moëlle osseuse de poulets infectés. Le récepteur Fc est un des moyens par lequel les macrophages interagissent avec les particules opsonisées (McConnell *et al.* 1993a) et ce récepteur est habituellement exprimé chez tous les macrophages de la moëlle osseuse chez les poulets en santé, mais ce récepteur n'était présent que chez 12% des macrophages de moëlle osseuse

chez des poulets inoculés avec le CAV depuis 21 jours (McConnell *et al.* 1993b). De façon similaire, la phagocytose d'érythrocytes de mouton par les macrophages de moëlle osseuse de poulets chute à 12% à 14 jours post-infection. Cependant, même si des variations fonctionnelles chez les macrophages de moëlle osseuse de poulets infectés ont été détectées, aucun antigène viral n'a été détecté, ce qui soulève un doute sur la réplication virale dans ces cellules pour expliquer cette perte de fonction (McConnell *et al.* 1993a).

Les cellules présentatrices d'antigènes de poulet telles que les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules B possèdent le récepteur B-F qui est l'homologue du récepteur CMH de classe II présent chez les mammifères (Adair *et al.* 1993). Il a été démontré par Adair *et al.* (1993) à l'aide d'histopathologie par immunomarquages, qu'un faible pourcentage des cellules infectées (6%) dans le thymus exprimaient le CMH de classe II. Les auteurs ont suggéré que probablement les cellules CMH de classe II positives étaient des cellules réticulaires qui avaient ingéré des thymocytes en processus d'apoptose. Dans la rate, les lymphocytes T matures expriment le CMH de classe II suite à une stimulation (Ewert *et al.* 1984). Aussi, une forte proportion des splénocytes infectés expriment le CMH de classe II, ce qui suggère que le CAV est capable d'infecter aussi des cellules T matures qui sont fortement activées (Adair *et al.* 1993). Dans la moëlle osseuse il été décrit qu'environ 37% des cellules infectées, exprimaient aussi le CMH de classe II (Adair *et al.* 1993).

#### **1.2.4.2 Les lymphocytes T**

Plusieurs études sur la pathogenèse du CAV ont démontré une perte des lymphocytes du cortex thymique ainsi que dans d'autres régions dépendantes des cellules T (Goryo *et al.* 1987; Jeurissen *et al.* 1989; Taniguchi *et al.* 1983), suggérant alors les cellules T ou les précurseurs des cellules T seraient des cibles pour le virus

(Adair *et al.* 1993). Ainsi il a été rapporté que le pourcentage de thymocytes CD8+ infectés était supérieur à celui des CD4+ lors de l'infection *in vivo* (Cloud *et al.* 1992; Bounous *et al.* 1995). Par contre, d'autres travaux n'ont plutôt rapporté aucune différence entre la diminution des deux sous-populations thymiques soit les cellules CD4+ et CD8+ (Hu *et al.* 1993). Cependant, les lymphocytes T matures CD8+ de la rate semblent être également infectés par le virus (Adair *et al.* 1993). Adair *et al.* (1993) ont montré, par double marquage des cellules de thymus de poulets infectées par le CAV, que les cellules T précurseurs étaient la cible pour le virus. Il a été montré que les cellules infectées n'exprimaient pas le récepteur de surface CD3, TCR- $\gamma\delta$  et TCR- $\alpha\beta$  montrant ainsi que les cellules infectées du thymus étaient les précurseurs des lymphocytes T (Adair *et al.* 1993). Il faut mentionner que le complexe CD3/TCR apparaît chez les cellules T, tôt après l'expression du CD4 et du CD8 (Chen *et al.* 1986). La détection de ce complexe à la surface membranaire indique une cellule T mature (Haynes *et al.* 1989). Cependant, le complexe CD3/TCR, avant d'être inséré à la surface membranaire, est exprimé dans le cytoplasme des cellules (Campana 1989). Une forte proportion des cellules T infectées, soit 57%, étaient positives pour le CD3 cytoplasmique (Adair *et al.* 1993). De plus, les cellules T n'exprimant pas le CD3 à leur surface étaient infectées au contraire des cellules T exprimant le CD3, ce qui renforce l'hypothèse que le CAV infecte les cellules précurseurs dans le thymus.

De plus, il y avait plus de cellules T CD8 (46%) infectées par le CAV que de cellules exprimant le CD4 (13%) dans le thymus. Il a été rapporté que l'antigène CD8 est exprimé à plus grande fréquence à la surface des thymocytes immatures et que cette expression survient juste avant l'apparition du co-récepteur CD4 (Cooper *et al.* 1992). Les co-récepteurs CD4 et CD8 sont exprimés ensemble par une même cellule T du thymus durant une courte période donnant la population double positive pour le phénotype CD4+CD8+ (Cooper *et al.* 1992). Toutefois, le fort pourcentage de

cellules CD8 infectées par le CAV peut aussi indiquer une infection de thymocytes immatures. De plus, il a été suggéré qu'une plus grande quantité de cellules exprimant le CD8 seraient infectées par le CAV, non seulement dans le thymus, mais également dans la rate (Adair *et al.* 1993).

Dans la rate, il a été rapporté que les splénocytes positifs pour l'antigène viral sont de phénotype CD8+, CD3+ et TCR- $\alpha\beta$ + démontrant ainsi une infection des cellules T matures. Cependant, il est possible que ces cellules aient été infectées en tant que précurseurs dans le thymus et suite à une maturation arrivent à la rate déjà infectées. D'autre part, les cellules infectées dans la rate, exprimant les marqueurs CD3, CD8 et TCR- $\alpha\beta$  correspondent en majorité au phénotype des cellules T cytotoxiques (Adair *et al.* 1993). D'autre part, les cellules T matures expriment le CMH de classe II après une stimulation (Ewert *et al.* 1984). Une proportion significative de splénocytes provenant de poulets infectés par le CAV exprimaient le CMH de classe II, ce qui supporte l'hypothèse que le CAV serait capable d'infecter des cellules T matures lorsqu'elles sont hautement activées (Adair *et al.* 1993).

Par contre, il a également été démontré par Hu *et al.* (1992) que les cellules ciblées par le CIA-1 (un variant de la souche CUX-1) dans le thymus de poulets infectées *in vivo*, sont les CD4+CD8+. Cette baisse de cellules précurseurs amènerait alors une dysfonction des cellules T auxiliaires et cytotoxiques *in vivo*.

#### 1.2.4.3 Les lymphocytes B

Les infections par le CAV ont le pouvoir d'affecter la réponse médiée par les cellules T mais aussi la réponse humorale qui implique les lymphocytes B (Cloud *et al.* 1992b). La population des lymphocytes B n'est pas susceptible à l'infection par le CAV, mais le dérèglement de cette population serait plutôt dû au manque de



disponibilité des cellules T auxiliaire (Th) et des cytokines produites par celles-ci telles que les IL-4 et IL-6 qui sont habituellement impliquées dans la réponse par les anticorps (Von Bülow *et al.* 1997; Box *et al.* 1988; De Boer *et al.* 1994). Par contre, le manque de susceptibilité de la population des cellules B à l'infection par le CAV devient cruciale pour la survie du poulet. Comme les plasmocytes ou cellules B activées sécrètent des anticorps, des études ont démontré que l'apparition d'anticorps anti-CAV dans le sérum coïncidait avec la disparition du virus dans le sang ainsi que dans divers organes et tissus (Yuasa *et al.* 1983a). Cependant, même en présence de ces anticorps en circulation, le virus continuait de persister dans de nombreux tissus, suggérant ainsi qu'il y a d'autres facteurs que les anticorps nécessaires au processus d'élimination virale (Yuasa *et al.* 1983a). Il a également été démontré chez des embryons de poulets ayant subi une boursectomie, la nécessité des anticorps anti-CAV pour le processus de guérison de ces poulets infectés (Hu *et al.* 1993a; Yuasa *et al.* 1983a).

#### **1.2.4.4 L'effet de l'infection par le CAV sur la production des cytokines**

En plus d'affecter directement les cellules précurseurs et certaines sous-populations lymphocytaires, le virus peut entraîner une baisse des cytokines nécessaires à la stimulation et à l'activation des lymphocytes. Lors de l'infection de poulets par le CAV, une diminution de la capacité des macrophages à produire de l'IL-1 a été constatée (McConnell *et al.* 1993a). La diminution de cette cytokine peut avoir des incidences sur l'augmentation ses infections secondaires qui sont, entre autre, un effet secondaire de la maladie induite par le CAV (McConnell *et al.* 1993a).

De plus, il a été constaté qu'en présence de CAV les lymphocytes présentaient une baisse du calcium cellulaire libre (Bounous *et al.* 1995). Comme la transcription des ARNm des lymphokines, telle que l'IL-2 est régulée par des protéines dépendantes du calcium libre, cette baisse de calcium suite à l'infection par le CAV



pourrait empêcher l'initiation de la réponse à l'antigène par les lymphocytes T (Premack *et al.* 1992). Une diminution de la transformation lymphocytaire et de la production du facteur de croissance des lymphocytes T (TCGF) ont aussi été constatées dans la rate en présence du CAV (Adair *et al.* 1991a).

De plus, comme il existe peu de tests ELISA commerciaux de détection de cytokines aviaires, la majorité des études jusqu'à maintenant ont été effectuées sur le niveau de transcription relatif de l'IFN- $\gamma$  produite par les lymphocytes CD8. Une étude récente menée par Markowski-Grimsrud et Schat (2003) a démontré que le CAV n'influence pas de manière significative les niveaux de transcription de l'IL-2 ou de l'IL-1 $\beta$  à 7 et 14 jours post-infection. Par contre, une faible transcription d'IFN- $\gamma$  a été induite par l'infection avec le CAV chez des poulets, possédant ou non des anticorps contre le CAV, à 7 jours post-infection. Cette transcription ne semble pas liée à la réplication virale à cause de la présence de poulets ayant déjà des anticorps anti-CAV. Cependant, ces résultats vont à l'encontre de ceux de l'équipe Adair *et al.* (1991) qui ont démontré une suppression de l'activité de l'IL-2 à 8 et 15 jours post-infection ainsi que des réductions significatives des titres d'IFN- $\gamma$  à 15, 22 et 29 jours post-infection. De la même manière, McConnell *et al.* (1993a) ont rapporté que l'exposition de poussins de 3 semaines au CAV, via une voie naturelle, diminue la production de l'IFN- $\gamma$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-2 à 14, 21 et 28 jours post-infection. Les différences entre ces études concernant la détection des cytokines induites par le CAV, sont probablement dues aux types de techniques employées (Markowski-Grimsrud et Schat 2003). Par contre, la diminution de ces cytokines après deux semaines pourrait contribuer à l'état d'immunosuppression, et affecterait le développement des lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) chez des poussins exposés subséquentement à des pathogènes (Markowski-Grimsrud et Schat 2003).

#### **1.2.4.5 L'effet de l'infection sur la réponse des cellules aux stimulations par la ConA et PHA.**

Les lectines telles que la Concanavaline A (ConA) et le Phytohémagglutinine (PHA) agissent comme des mitogènes en stimulant de manière sélective les cellules T autant chez la souris que chez les poulets (Toivanen et Toivanen 1973). Une étude menée par Adair *et al.* (1991) a montré qu'il y aurait une destruction d'une population de cellules dans le thymus qui se traduirait par une réduction du nombre de cellules de rate répondant à la stimulation par le ConA chez des poulets de 8 et 15 jours post-infection. La faible réponse à la transformation lymphocytaire par ces lectines après stimulation à la ConA est similaire aux résultats obtenus par Otaki *et al.* (1988a) sur les baisses de réponse à la PHA de 12 à 13 jours après l'inoculation du CAV chez des poulets âgés de 1 et 7 jours.

Il a également été démontré par McNeilly *et al.* (1994) que l'infection *in vitro* de cellules de rate de poulets stimulées et non-stimulées par la ConA entraînait la présence des cellules mononucléaires infectées. Ainsi l'augmentation de cellules infectées après l'activation par la ConA pourrait être due à la préférence du virus pour les lymphocytes activés. Aussi, aucune cellule infectée par le CAV n'a été détectée chez des cellules mononucléaires non-stimulées dérivées du thymus.

#### **1.2.5 Les vaccins**

La maladie induite par le CAV peut être contrôlée par le développement d'anticorps antiviraux dans les élevages avant la ponte (McNulty, 1991). Vers les années 1980, en Allemagne, le transfert de la litière provenant de reproducteurs ayant eu une progéniture affectée par le CAV dans la litière des nouveaux reproducteurs, assurait une protection des poussins contre l'infection. Afin de garantir une bonne protection, en plus des transferts de litière, les troupeaux de poulets recevaient de

l'eau à boire contenant un homogénat de foies provenant de poulets affectés par ce syndrome (Vielitz et Landgraf 1988).

Aujourd'hui, à cause des pertes économiques qu'occasionne l'infection par le CAV, plusieurs vaccins vivants, atténués ou recombinants sont mis à la disposition des agriculteurs (Todd 2000). La séroconversion peut être acquise par l'entremise de vaccins vivants. Le vaccin vivant non-atténué, obtenu par la propagation du CAV sur des embryons de poulet, est administré dans l'eau de consommation à des poulets de 13 à 15 semaines (Vielitz et Voss 1994). Il existe également un vaccin atténué qui est administré par voie parentale et qui est disponible sur le marché (Steenhuisen *et al.* 1994). Par contre, le tropisme des souches vaccinales non-atténuées et atténuées pour les cellules précurseurs myéloïdes et thymiques n'est pas connu, pas plus que les effets immunosuppresseurs qu'ils pourraient induire. Un vaccin recombinant basé sur les sous-unités d'ADN viral a aussi été mis au point. Il a été démontré que l'inoculation de poulets avec des protéines du CAV, produites par des cellules d'insectes par une co-infection avec un baculovirus recombinant exprimant les gènes VP1 et VP2 du CAV, entraînait la production d'anticorps neutralisants qui protégeaient les jeunes poulets contre l'anémie aviaire (Koch *et al.* 1995).

### 1.3 L'apoptose

L'apoptose est une forme physiologique de la mort cellulaire et un processus important dans le développement et de la réponse immune. Elle se caractérise par le rétrécissement des cellules, la segmentation du noyau, la condensation et la dégradation internucléosomale de l'ADN (Arends et Wyllie 1991; Wyllie *et al.* 1980). Le CAV est reconnu pour causer l'apoptose des cellules précurseurs tels que hémocytoblastes et les lymphocytes T précurseurs (Adair 2000). Ainsi, le CAV utilise le mécanisme de l'apoptose de la cellule cible par l'entremise de l'apoptine (VP3) (Noteborn *et al.* 1994). Cette protéine est co-localisée, tôt après l'infection,

avec l'ADN cellulaire. Plus tard dans l'infection, cette protéine est liée aux agrégats nucléaires reconnus comme des corps apoptotiques. Les cellules de la lignée cellulaire MDCC-MSB1, lymphocytes transformés par le virus de Marek's servant à la production virale *in vitro*, deviennent apoptotiques après 64 heures d'infection. Il a également été démontré que l'expression de la VP3 dans les cellules MDCC-MSB1 transfectées est suffisante pour causer l'apoptose dans un délai de trois jours. Les immunoessais ont révélé que la protéine VP3 se retrouve strictement dans les structures de chromatine cellulaire. Cependant, le ou les mécanismes par lequel la protéine VP3 induit l'apoptose ne sont pas encore connus (Danen-van Oorschot *et al.* 1997).

En effet, plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer comment la protéine VP3 peut induire l'apoptose chez les cellules cibles (Jeurissen *et al.* 1992b; Noteborn *et al.* 1994). La première implique l'interaction entre les protéines virales et les acides nucléiques de la cellule hôte ou même avec des protéines de la chromatine cellulaire. Cette interaction désorganiserait la chromatine et rendrait la cellule susceptible à la fragmentation par les endonucléases. Cependant, l'étude de Douglas *et al.* (1995) a démontré que dans le processus d'apoptose, les inclusions nucléaires observées sont exclusives à VP3 et non pas à VP2.

Cependant, il a été établi par Zhuang *et al.* (1995a) lors d'une étude des effets de l'apoptine sur des cellules d'ostéosarcomes humains, que l'apoptose était indépendante de la p53 et ne pouvait pas être bloquée par le Bcl-2 (Zhuang *et al.* 1995a et Zhuang *et al.* 1995b). De plus, il a également été démontré que l'apoptine ne nécessite pas l'activation des caspases débutant la cascade, soit les caspases 1 et 8, mais que l'activation de l'une ou de plusieurs des caspases impliquées plus loin dans la cascade (caspases 3, 6 et 7) sont nécessaires pour l'induction rapide de la mort cellulaire par apoptose (Danen-van Oorschot *et al.* 2000). En effet, ces auteurs ont prouvé que la caspase 3 est activée durant l'induction de la mort cellulaire par

l'apoptine, mais que cette activation semble apparaître à un stade tardif. Il faut souligner que la forme active de la caspase 3 peut cliver la poly-(ADP-ribose) polymérase (PARP), qui est une enzyme qui est impliquée dans la réparation de l'ADN et dans la surveillance de l'intégrité du génome cellulaire (Gurtu *et al.* 1997). Par contre, le rôle des mitochondries et du cytochrome c dans l'apoptose reste à élucider (Zhuang *et al.* 1995a,1995b).

#### **1.4 L'immunologie aviaire**

Afin de mieux comprendre les effets du CAV chez les jeunes poussins immunologiquement immatures, il faut regarder de plus près les processus de maturation hémopoïétiques et lymphocytaires.

##### **1.4.1 La colonisation des organes lymphoïdes durant l'embryogenèse**

Lors du développement embryonnaire, les cellules stromales hématoïétiques proviennent du sac vitellin et vont coloniser les amas intra-aortiques et ensuite les foyers para-aortiques. Le foie aviaire, contrairement à celui des mammifères qui supporte l'hématopoïèse avant la naissance, joue un rôle mineur dans le maintien de l'hématopoïèse à partir du 14<sup>e</sup> jour de l'embryogenèse jusqu'à l'éclosion (21<sup>e</sup> jour). Alors, ce sont les amas intra-aortiques et ensuite les foyers para-aortiques qui durant les 5 premiers jours de l'embryogenèse, produisent des érythrocytes, des cellules myéloïdes et des cellules précurseurs T et B. Ensuite, vers le 12<sup>e</sup> jour d'embryogenèse, les cellules souches érythropoïétiques, les cellules T et B colonisent la rate tandis que la bourse de Fabricius est colonisée par des cellules souches extra-bursales vers le 8<sup>e</sup> jour de l'embryogenèse. Le micro-environnement de la bourse formé par les cellules précurseurs permet la différenciation et le développement des cellules B. Le thymus est colonisé par les cellules progénitrices en trois temps bien distincts (7<sup>e</sup>, 12<sup>e</sup> et 18<sup>e</sup> jour d'embryogenèse). Quant à la moëlle

osseuse, elle est le dernier organe à être colonisé et elle prend graduellement la relève de l'hématopoïèse des érythrocytes, des cellules T et B précurseurs et des cellules myéloïdes à partir du 10<sup>e</sup> jour d'embryogenèse (Siatskas et Boyd 2000).

#### 1.4.2 Les organes lymphoïdes primaires et secondaires

Après l'éclosion, la maturation lymphoïde se produit dans la moëlle osseuse, le thymus et la bourse de Fabricius, et les cellules matures se rendent dans les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate, les ganglions et les amygdales caecales (analogues aux plaques de Peyer). La moëlle osseuse des poussins naissants, comme celle des mammifères, est responsable de l'hématopoïèse, donc elle contient les cellules précurseurs des granulocytes, des cellules de l'immunité innée (cellules NK) et des lymphocytes T et B (Jeurissen *et al.* 2000). Les précurseurs myéloïdes présentant à leur surface le marqueur BEN<sup>+</sup> génèrent des macrophages, des granulocytes, des thrombocytes et des érythrocytes (Siatskas et Boyd 2000). Il a aussi été démontré que les cellules de moëlle osseuse présentent la molécule d'adhésion HEMCAM<sup>+</sup> à leur surface et co-expriment le récepteur tyrosine kinase (c-kit). Ces cellules peuvent se différencier en cellules myéloïdes et érythroïdes et peuvent également coloniser le thymus (Vainio *et al.* 1996). De plus, les cellules hématopoïétiques ainsi que les progéniteurs des lymphocytes T possèdent la glycoprotéine IIb-IIIa à leur surface (Ody *et al.* 1999). D'autre part, il est connu chez les mammifères que le processus de différenciation de cellules immatures de la moëlle osseuse en cellules hématopoïétiques matures nécessite l'activité de plusieurs cytokines. Ce réseau de cytokines comprend l'IL-7 et les facteurs de stimulation de colonies (CSF) comme le granulocyte monocyte-facteur de stimulation de colonies (GM-CSF) (Siatskas et Boyd 2000; Nicolas-Bolnet *et al.* 1995). Chez le poulet le facteur de croissance myelomonocytaire de poulet (cMGF) a une forte homologie dans la séquence des acides aminés à celle des cytokines GM-CSF et IL-6 murines et humaines (Leutz *et al.* 1989). Il a également été rapporté que les facteurs de

stimulation des colonies (CSF) et l'IL-7 sont très importants dans la régulation de la différenciation des précurseurs des cellules T (Mukamoto et Kodama 2000). De plus, une exposition prolongée des cellules de moëlle osseuse au facteur GM-CSF entraîne une accumulation des macrophages activés (Burgess *et al.* 1989).

Le thymus est un organe multilobé situé à la hauteur du cou de chaque côté de l'œsophage dont chaque lobule est séparé en un compartiment externe ou cortex, qui contient en abondance des cellules immatures T (thymocytes) CD4+CD8+, et un compartiment interne ou médulla, où se retrouvent des thymocytes exprimant les molécules du récepteur T (TCR) $\alpha\beta$  associé aux molécules du CD3 ainsi que les molécules CD4 ou CD8, correspondant à des thymocytes en fin de maturation (Bucy *et al.* 1990). Le cortex et la médulla du thymus sont enchevêtrés par un réseau tridimensionnel de cellules stromales, composés de cellules épithéliales, de cellules dendritiques interdigitées et de macrophages qui constituent la charpente de l'organe et contribuent à la croissance et à la maturation des thymocytes. De plus, les thymocytes expriment différents marqueurs selon leur stade de maturation, car ceux exprimant faiblement le CD45 (CD45<sup>low</sup>) expriment aussi les CD3-4+8+. Ainsi tous les thymocytes CD45<sup>low</sup> sont CD3-, mais les populations de thymocytes exprimant fortement le CD45 (CD45<sup>high</sup>) peuvent être CD3-, CD3<sup>low</sup> et CD3<sup>high</sup>. Aussi, la transition de CD45<sup>low</sup> à CD45<sup>high</sup> arrive au moment où les thymocytes immatures expriment fortement le CD4 et le CD8 à leur surface, mais tout en ayant acquis aussi les molécules du CD3 (Paramithiotis *et al.* 1991).

La bourse de Fabricius est un tissu lymphoïde associé à l'intestin et il est le site de prolifération, de maturation et de différenciation des lymphocytes B. Cet organe est donc impliqué dans la production d'anticorps et par conséquent dans l'immunité humorale. Ces cellules, avant d'être activées par la présence d'un antigène, présentent à leur surface l'anticorps IgM (Jeurissen *et al.* 2000). Différentes

études ont démontré qu'il y a présence de l'anticorps IgM chez la majorité des lymphocytes B précurseurs présents dans la moëlle osseuse et dans la bourse de Fabricius, la bourse étant le site de maturation des lymphocytes B chez le poulet (Ratcliffe *et al.* 1986; Tao-Wiedmann *et al.* 1975; Grossi *et al.* 1977). Il a été observé que durant l'embryogenèse la présence de d'anticorps IgM dans le cytoplasme (cIgM) des lymphocytes B se rendait graduellement en surface (sIgM). Ainsi, à 16 jours d'embryogenèse des cellules cIgM+sIgM+ sont détectées dans la bourse, la rate et dans le sang périphérique, tandis qu'au premier jour d'éclosion (21<sup>e</sup> jour d'embryogenèse) il est possible de distinguer des lymphocytes B cIgM+sIgM+ dans la bourse, la moëlle osseuse, la rate et dans le sang périphérique, mais il est aussi possible d'observer des lymphocytes B cIgM-sIgM+ dans la moëlle osseuse, la rate et le sang périphérique ce qui indique qu'à l'éclosion le poussin possède quelques lymphocytes B ayant surtout des IgM à la surface (Grossi *et al.* 1977). Par la suite, ces cellules B cIgM-sIgM+ augmentent chez les poulets de 2 à 24 semaines dans la moëlle osseuse, la rate et le sang périphérique tandis que la bourse contient toujours des lymphocytes B exclusivement cIgM+sIgM+ (Grossi *et al.* 1977).

Les organes lymphoïdes secondaires apparaissent plus tard dans le développement fœtal aviaire que les organes lymphoïdes primaires. Les organes lymphoïdes secondaires répondent à la stimulation antigénique et sont riches en macrophages et cellules dendritiques (cellules présentatrices d'antigènes) et en lymphocytes T et B servant à la médiation cellulaire. Ces organes sont la rate, les ganglions, et le système lymphatique.

### **1.4.3 Les cellules immunes**

#### **1.4.3.1 Les cellules présentatrices d'antigènes**

Chez les poulets, les macrophages, les cellules dendritiques présentatrices d'antigènes et les lymphocytes B, forment le centre de la réponse innée et adaptée.



Outre les lymphocytes B qui ne sont pas des cellules phagocytaires, les macrophages et les cellules dendritiques sont des cellules phagocytaires qui peuvent être détectés par l'expression du marqueur B-L qui est l'équivalent du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) chez les mammifères (Ewert *et al.* 1984). Il a été démontré que chez des poulets de plus de 5 semaines il y a environ 10% des cellules qui expriment le récepteur B-L dans le thymus, 65% dans le sang et 85% dans la rate. Ces cellules sont en effet des cellules adhérentes (Peck *et al.* 1982). Il a, par contre, été rapporté par Adair *et al.* (1993), que chez les poussins de 6 jours il y a une présence de 5% de cellules positives pour le CMH de classe II (B-L) dans le thymus, 40% dans la rate et 30% dans la moëlle osseuse. Les macrophages, chez le poulet, ont été retrouvés dans la rate, mais aussi dans le thymus (Guillemot *et al.* 1984). Lorsque ces cellules sont stimulées par des substances étrangères, elles produisent plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ) et l'interleukine-1 (IL-1). Le TNF- $\alpha$  stimule sa propre production par les macrophages ainsi que la production de l'IL-1 et l'IL-6. De la même manière, l'IL-1 stimule sa propre production par les macrophages ainsi que la production de TNF- $\alpha$  et IL-6. Cependant, l'IL-6 a un effet négatif sur la production de TNF- $\alpha$  et de IL-1 par les macrophages. Alors, puisque la production de cytokines est strictement reliée à l'activation initiale des macrophages par un pathogène ou une substance étrangère, la quantité de cytokines produites reflète l'activité des macrophages (Jeurissen *et al.* 2000). Cependant les rôles de ces cytokines sur les activités des macrophages de poulets sont encore à l'étude (Kaiser *et al.* 2000). Il est reconnu que les cytokines pro-inflammatoires TNF- $\beta$  et IL-1 sont impliqués dans le déclenchement de la fièvre chez les mammifères et il semblerait que ce mécanisme soit similaire chez les poulets (Leshchinsky et Klasing 2001). L'IL-6 serait plutôt impliquée comme un facteur de stimulation des hépatocytes, favorisant ainsi la production de la fibronectine par les hépatocytes (Jeurissen *et al.* 2000).

#### 1.4.3.2 Les cellules NK

Les cellules NK ont une activité cytotoxique contre les cellules tumorales ou les cellules infectées par un virus. Les cellules NK sont présentes en forte quantité dans des tissus infectés dans les premiers jours de l'infection. Les cellules NK amènent la lyse cellulaire des cellules infectées et cela bien avant que la réponse par les lymphocytes T cytotoxiques soit activée. Par contre, l'activité des cellules NK semble être très faible chez les poussins de moins de quatre semaines, mais facilement détectable chez les poulets adultes (Jeurissen *et al.* 2000). Les cellules NK aviaires se caractérisent par le phénotype suivant : CD3-CD8+CD4- (Thomas *et al.* 2001). En effet, il a été démontré par Göbel *et al.* (2001) que la quantité de cellules NK dans les tissus périphériques d'oiseaux est plus faible que chez ceux des mammifères.

Chez les poulets les cellules NK sont générées dans la moëlle osseuse à partir des cellules souches pluripotentes et migrent ensuite dans différents sites. Cependant, il n'est pas encore clair comment et quand les cellules NK sont sélectionnées. La présence des cellules NK dans les rates d'embryons de poulets suggère aussi qu'une portion de la différenciation pourrait aussi s'effectuer dans la rate (Göbel *et al.* 2001).

#### 1.4.3.3 Les lymphocytes T

La réponse immune par les lymphocytes T fait partie de la réponse immune adaptée soit à médiation cellulaire et humorale. Chez les lymphocytes T de poulet, des molécules de surface homologues à celles présentées par les cellules T de mammifères ont été identifiées. L'expression du marqueur CD3 associé avec celle du TCR $\alpha\beta$  (TCR2) et des molécules de co-activation CD4 et CD8 définissent la majorité de la population des thymocytes de poulet et ce, tout comme chez les mammifères, indique que la maturation des cellules T dans le thymus de poulet suit une voie

similaire à celle observée chez les mammifères (Chan *et al.* 1988, Chen *et al.* 1988 et Chen *et al.* 1990). La molécule TCR- $\alpha\beta$  (TCR-2) est un complexe fixé à la surface de la cellule qui agit comme un récepteur liant l'antigène, tout comme les molécules d'immunoglobulines chez les lymphocytes B (Jeurissen *et al.* 2000). Il existe également un TCR $\gamma\delta$ , soit le TCR1, qui apparaît chez les oiseaux vers le 12 jours de l'embryogenèse, mais qui, contrairement aux mammifères demeure relativement abondant chez l'oiseau adulte, soit environ 8% des thymocytes et 25 à 30% des cellules T du sang et de la rate (Sowder *et al.* 1988). Il a été démontré chez le poulet que les cellules TCR2+ ayant le marqueur CD4 (cellules auxiliaires) sont situées principalement dans la gaine périartérielle de la rate et dans la *lamina propria* de l'intestin, tandis que les cellules TCR1+ sont situées principalement dans les sinus de la rate et dans l'épithélium intestinal (Bucy *et al.* 1988). Contrairement aux cellules TCR2+ qui sont plutôt auxiliaires, les cellules TCR1+ exercent une activité cytotoxique (Bucy *et al.* 1988). Les thymocytes exprimant le TCR $\gamma\delta$  (TCR1+) expriment également le CD45 tout en étant CD4-CD8- (Paramithiotis *et al.* 1991). Tout comme les mammifères, les lymphocytes T de poulet qui expriment le marqueur CD4 sont reliés à une fonction auxiliaire durant les réponses à médiation cellulaire et humorale, tandis que ceux qui expriment le marqueur CD8 sont associés à une fonction cytotoxique, ayant pour but de tuer la cellule-cible qui présente un antigène sur sa molécule de CMH I (B-F) (Jeurissen *et al.* 2000).

#### 1.4.3.4 Les lymphocytes B

Il existe chez le poulet trois classes d'immunoglobulines les IgM, les IgY, et les IgA qui sont produites par les plasmoblastes et les plasmocytes. Il a été montré par Leslie et Clem (1969), que l'immunoglobuline (Ig) la plus abondante chez le poussin est l'IgY, qui a des ressemblances avec l'IgG des mammifères. L'activité de l'anticorps IgY paraît combiner deux fonctions qui sont habituellement faites

séparément par l'IgG et l'IgE. Alors tout comme l'IgG, l'IgY fait partie majoritairement du mécanisme de défense contre les infections systémiques et comme l'IgE, l'IgY possède la capacité de médier des réactions anaphylactiques (Faith et Clem 1973). Chaque lymphocyte B possède un IgM à la surface avec une certaine spécificité antigénique. Lorsque les lymphocytes B rencontrent pour la première fois un pathogène ou un antigène, ils se lient entièrement ou partiellement par l'entremise des molécules IgM. Cependant, les lymphocytes B nécessitent plusieurs signaux de co-stimulation venant des lymphocytes T et des autres plasmoblastes. Ainsi, les lymphocytes B deviennent des plasmocytes et produisent des anticorps spécifiques permettant de terminer la réponse immune contre le pathogène. Au même moment il y a formation des cellules mémoires et qui seront disponibles pour effectuer une réponse immune bien plus rapidement si jamais le même pathogène se présente. L'efficacité et la spécificité des anticorps se produit par la production d'anticorps IgY qui remplacent les IgM (Jeurissen *et al.* 2000).

La présence de lymphocytes B a été démontré par Boyd et Ward (1978), chez des poulets de 3 à 12 semaines, à des concentrations d'environ 80% dans la bourse, de 34% dans la rate, de 15% dans la moëlle osseuse, de 6% dans le thymus et de 19% dans le sang périphérique. Parmi ces cellules, environ 58% dans la bourse, 14% dans la rate, 8% dans la moëlle osseuse, 1% dans le thymus et 6% dans le sang périphérique montrent des IgY de surface positives (Boyd et Ward 1978). Lorsque les lymphocytes B rencontrent un pathogène ou antigène pour la première fois, ils sécrètent des IgM. Cependant, suite à des signaux issus d'une co-stimulation par les cellules T CD4+ certains lymphocytes B deviennent alors des plasmoblastes et débutent la sécrétion d'anticorps spécifiques (Jeurissen *et al.* 2000). Il y a par la suite formation de cellules B mémoires qui sont disponibles pour une éventuelle ré-infection par le pathogène.

#### 1.4.4 Les cytokines aviaires

La régulation des réponses de l'immunité innée et adaptative dépend des cytokines produites par plusieurs cellules immunitaires, mais aussi par d'autres cellules de l'organisme. Les cytokines appartiennent à diverses familles de protéines qui jouent un rôle crucial dans le contrôle du système immunitaire. Selon le type de combinaisons de cytokines produites, une réponse immune protectrice ou non peut être générée (Lowenthal *et al.* 2000). Il existe un grand nombre de ces cytokines dont seulement certaines sont mieux connues dans le système aviaire. Compte tenu des effets présumés du CAV sur les macrophages et les lymphocytes T, nous allons plutôt nous intéresser aux cytokines les plus importantes produites par ces cellules. Chez les macrophages, les principales cytokines produites lors d'une infection virale sont le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et IL-6. Les macrophages peuvent être activés par l'IFN- $\gamma$  qui va augmenter la production des cytokines macrophagiques. Généralement ces cytokines activent l'axe hypothalamo-pituitaire-adrénal et sont impliquées dans le déclenchement de la réponse inflammatoire générant de la fièvre, anorexie et libération des protéines de la phase aigüe (Leshchinsky et Klasing 2001). Le TNF- $\alpha$  est habituellement sécrété par les macrophages afin d'augmenter l'activité cytolytique pour des cellules cibles telles que les fibroblastes ou adipocytes. L'IL-6 est produite par des macrophages et aussi par des fibroblastes afin d'augmenter la synthèse de fibrogènes par les hépatocytes (Siatskas et Boyd 2000).

L'IL-1 est une cytokine primordiale dans l'induction de la réponse inflammatoire (Flad *et al.* 1989) puisqu'elle est essentielle pour la maturation des lymphocytes T dans le thymus et la stimulation des lymphocytes T en présence d'antigènes. Ainsi, l'IL-1 joue un rôle central dans la régulation du développement et de l'activation des lymphocytes T et B, elle est aussi requise dans la maturation des précurseurs des cellules T thymiques et cellules B, dans la synthèse et l'expression des récepteurs à lymphokines et dans la prolifération des lymphocytes (Flad *et al.*

1989). Ainsi il a été décrit par Dinarello (1998) que l'IL-1 chez les mammifères possède la capacité d'induire la prolifération des cellules du thymus qui ont été exposées à des faibles doses de mitogènes. Une bioactivité similaire a été décrite chez le poulet (Bombara et Taylor 1991; Hayari *et al.* 1982). Cette cytokine est habituellement sécrétée par les macrophages, qui sont toujours présents lors de réactions inflammatoires. L'IL-1 de poulet tout comme celle des mammifères possède plusieurs autres bioactivités qui sont pro-inflammatoires telles que la co-induction de la prolifération des thymocytes, la fièvre, l'anorexie, le catabolisme squelettique du muscle, la libération de corticostéroïdes, libération de protéoglycanes du cartilage et des changements aigus dans le métabolisme des minéraux (Klasing 1984; Klasing et Johnstone 1991).

Les cytokines lymphocytaires sont particulièrement importantes dans la régulation de la réponse immune adaptative. Ainsi, l'IL-2 et l'IFN- $\gamma$  vont favoriser l'activité cytolytique par les lymphocytes CD8 alors que les cytokines IL-4, IL-5 et TGF- $\beta$  vont plutôt stimuler la réponse humorale.

Les études sur l'IFN- $\gamma$  ont démontré que la séquence d'acides nucléiques de l'IFN- $\gamma$  de poulet ne possède que 32% d'homologie avec la séquence de l'IFN- $\gamma$  humain. Cependant, il y a des fortes similarités quant aux fonctions de l'IFN- $\gamma$ , incluant l'activation des macrophages et leur capacité à sécréter des nitrites tel que le NO (Digby et Lowenthal 1995; Song *et al.* 1997). En plus de son activité anti-virale, lorsqu'il est produit par les cellules T auxiliaires CD4+CD8- de poulet, l'IFN- $\gamma$  sert à augmenter la reconnaissance immune ainsi que des fonctions d'activation des macrophages (Kaspers *et al.* 1994; Song *et al.* 1997). L'IFN- $\gamma$  de poulet possède plusieurs caractéristiques communes avec celui des mammifères telles que l'augmentation de l'expression des molécules de CMH I et II par les macrophages et

la protection anti-virale des fibroblastes contre la lyse causée par les virus (Siatskas et Boyd 2000; Song *et al.* 1997).

La cytokine IL-2 chez le poulet a des fonctions immunes similaires *in vivo* et *in vitro*. Elle augmente la prolifération des cellules T et la cytotoxicité spontanée. Des analyses moléculaires comparatives des gènes codant pour l'IL-2 et l'IL-15 de poulet ont démontré que ces deux gènes ont une homologie plus grande avec la séquence du gène codant pour l'IL-15 de mammifères qu'avec celui de l'IL-2 (Lillehoj *et al.* 2001). De plus, l'IL-2 et l'IL-15 de poulet stimulent les lymphoblastes T et augmentent la cytotoxicité spontanée des cellules NK *in vitro* (Miyamoto *et al.* 2001).

Le facteur de croissance de cellules T (TGF- $\beta$ ) possède une influence immunomodulatrice sur la progression du cycle lymphocytaire et son effet est contextuel impliquant des effets inhibiteurs sur des lymphocytes matures et des effets stimulants sur la croissance des lymphocytes immatures. De plus, il a été démontré que le TGF- $\beta$  augmente la croissance des thymocytes immatures possédant le phénotype CD4+CD8+ (Peters *et al.* 2003). En fait, le TGF- $\beta$  prolonge la phase S et retarde la progression des lymphocytes en phase G1 du cycle cellulaire (Peters *et al.* 2003). Des homologues fonctionnels de TGF- $\beta$  ont été démontrés chez différentes espèces. Les TGF- $\beta$ 1, 2 et 3 sont présents chez les mammifères et les oiseaux (Mukamoto et Kodama 2000) et il y a une homologie de plus de 75% entre les acides aminés des TGF- $\beta$ s humains et ceux du poulet. Aussi, les TGF- $\beta$  4 et 5 ont été isolés respectivement chez le poulet (Jakowlew *et al.* 1988) et chez les amphibiens (Kondaiah *et al.* 1990). Peu d'études existent sur les fonctions du TGF- $\beta$  et les infections virales, cependant, il a été établi que le TGF- $\beta$ 4 aviaire était l'homologue du TGF- $\beta$ 1 murin et que les fonctions en cas d'infection parasitaire semblent être les mêmes. Le TGF- $\beta$  est une cytokine ayant des fonctions de chimiotactisme pour les monocytes et lymphocytes T (Jakowlew *et al.* 1997).

#### 1.4.5 La stimulation du système immunitaire aviaire par le LPS et les lectines.

Généralement, l'activation et la prolifération lymphocytaires induites par le contact avec un antigène se déroulent au sein des tissus lymphoïdes mais elles peuvent être étudiées *in vitro* en cultivant un lymphocyte avec un mitogène. L'exposition des macrophages au lipopolysaccharide (LPS) de bactéries gram-négatives initie une grande variété de changements physiologiques, immunologiques, métaboliques chez l'organisme hôte (Berczi 1998). Les monocytes/macrophages jouent un rôle central dans la réaction inflammatoire induite par le LPS. Ainsi l'interaction entre le LPS et le récepteur CD14 présent à la surface de ces cellules entraîne la libération des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-8 (Rietschel *et al.* 1998). Les études des effets du LPS et des mécanismes de la réponse septique chez les poulets sont limitées comparé à celles déjà effectuées chez les mammifères. Une des raisons est que les poulets sont plus résistants aux endotoxines provenant de bactéries gram-négatives. Cependant, il a été démontré qu'il est possible d'induire chez les poulets une réponse aiguë à l'endotoxine (Xie *et al.* 2000). Il a été démontré que l'infection par le virus de l'influenza de lignées de macrophages aviaires (HD11), des cellules ayant les caractéristiques typiques des macrophages aviaires, cause une diminution de la production de nitrites (NO). Par contre, la présence de LPS augmente la production de NO chez ces mêmes macrophages infectés à l'influenza (Lyon et Hinshaw 1993). Des résultats similaires ont été obtenus dans une autre étude concernant des macrophages infectés par un réovirus aviaire (Pertile *et al.* 1996).

Par ailleurs, les lectines telles que la concanavaline A (Con A) et la phytohémagglutinine (PHA) miment les propriétés mitogéniques et sont utilisées pour stimuler les lymphocytes T. Il a été démontré que la ConA stimule d'abord la mitogénèse des cellules T en se liant aux résidus de carbohydrates présents sur le récepteur CD3 (Toivanen et Toivanen 1973). Après l'augmentation de calcium



engendrée par ce lien, plusieurs molécules effectrices se lient directement au calcium ou s'associent avec des protéines spécialisées à se lier au calcium qui agissent comme des senseurs à calcium. Ainsi, cette régulation des molécules par le calcium est critique dans l'induction précoce des événements de l'activation des cellules T, tels que l'induction d'ARNm pour les cytokines lymphocytaires dont l'IL-2 pour la mitogenèse (Toivanen et Toivanen 1973).

Chez le poulet il a été démontré que les lymphocytes de rate provenant d'embryons de poulets ou de poussins de un jour, sont incapables de répondre à la ConA ou la PHA (Kline et Sanders 1980) tout comme les splénocytes néonataux murins (Papiernik et Bach 1979). La nature du phénomène auquel les lymphocytes T de poussins récemment éclos sont incapables de répondre à la ConA ou la PHA sont encore inconnus. Cependant, il se pourrait que l'immaturité des lymphocytes les rendrait incapables de lier et procéder proprement les mitogènes (Papiernik et Bach 1979). Par contre, les cellules de moëlle osseuse provenant de poulets de n'importe quel âge inhibent la réponse blastique des lymphocytes de rate induite par les mitogènes ConA ou PHA (Papiernik et Bach 1979). Il a été montré que plusieurs types de particules virales, incluant la leucocytose aviaire, les sarcomes, le virus Sendai et autres, lorsque incubées avec des lymphocytes aviaires périphériques sanguins et de la ConA ou de la PHA inhibent l'effet mitogénique habituellement induit par ces lectines (Wainberg *et al.* 1980).

## 1.5 HYPOTHÈSES

Le CAV affecte de manière générale des cellules précurseurs qui sont nécessaires à la formation d'un système immunitaire adéquat ainsi qu'au développement des érythrocytes, cellules servant au transport d'oxygène dans les tissus. Il a été montré *in vivo* que le CAV infectait les lymphocytes T précurseurs corticaux du thymus, les hémocytoblastes de la moëlle osseuse et les lymphocytes T activés de la rate. Il a aussi été démontré *in vivo* que l'infection par le CAV de ces cellules cibles entraînait un dysfonctionnement immunitaire et, par conséquent, pouvait favoriser une immunodéficience chez le poussin. Par contre, l'importance de la permissivité de ces cellules à l'infection virale dans le développement de l'immunodéficience et les mécanismes responsables des dysfonctionnements immunitaires n'ont pas été totalement identifiés. Nous proposons ainsi de vérifier si la perte des cellules immunitaires du thymus et de la moëlle osseuse observée chez des poussins infectés par le CAV est due à la permissivité de ces cellules à la réplication virale. Cette hypothèse sera étudiée par une approche *in vitro*, principalement des lymphocytes précurseurs CD4+CD8+ et les macrophages myéloïdes. Comme le CAV semble mieux se répliquer dans les cellules activées, nous allons aussi vérifier si l'activation des lymphocytes peut aggraver les effets apoptotiques du virus. Aussi il est possible que les baisses de fonctions macrophagiques observées *in vivo* puissent être reliées à l'infection virale, ce que nous allons vérifier par une approche *in vitro*. Ainsi, l'infection virale pourrait induire l'apoptose de ces cellules, entraînant des déficits immunitaires par une diminution des cellules en maturation dans le thymus et la moëlle osseuse, expliquant alors la plus forte sensibilité des poussins à des infections secondaires.

# **CHAPITRE 2**

## **MÉTHODOLOGIE**

### **2.1 Virus et cellules**

#### **2.1.1 Oiseaux**

Des œufs embryonnés exempts d'agents pathogènes spécifiques (SPF) provenant de la ferme d'élevage d'Agriculture Canada (Nepean, Ontario) ont été gardés dans des locaux de confinement situés à l'animalerie de l'Université du Québec à Montréal. Ces oiseaux ont été traités et nourris selon les normes du Conseil Canadien de la Protection des Animaux. À différents temps après l'éclosion, les poussins ont été utilisés pour l'extraction d'organes lymphoïdes, la culture des cellules immunitaires et les infections *in vitro*. Les poussins ont été euthanasiés par inhalation de CO<sub>2</sub>. Dans certaines expériences, des poussins commerciaux (Mirabel, Québec) ont aussi été utilisés.

#### **2.1.2 Virus**

Deux souches virales de CAV furent utilisées, soit la souche de référence CUX-1 et la souche atténuée CIA-1. Les souches virales ont été obtenues de Dr. K Schat (Université Cornell, Ithaca, NY) et ont été répliquées sur des cellules MDCC-CU147, provenant également du laboratoire de Dr. Schat (Calnek *et al.* 2000).

#### **2.1.3 Cellules**

##### **2.1.3.1. Les cellules MDCC-CU147**

Les cellules MDCC-CU147 ont servi à la production virale et lors de techniques d'isolement et de titrage viral. Cette lignée cellulaire provient de

lymphocytes aviaires transformés par le virus de Marek (Calnek *et al.* 1999). Ces cellules ont été mises en culture dans un milieu Leibowitz-McCoy (milieu LM) (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) additionné de 10% de sérum de veau fœtal non-décomplémenté (SVF) (Hyclone, Edmonton, Canada) et supplémenté en glutamine, pyruvate de sodium, bicarbonate de sodium, tryptose phosphate (Gibco Laboratories) et 2-mercaptoéthanol (Gibco Laboratories) (milieu LM complet). Les cellules ont été incubées à 39°C, sous une atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont subi un nombre suffisant de passages par dilution 1:4 avec du milieu LM complet jusqu'à ce qu'elles atteignent une concentration de  $3 \times 10^6$  cellules/ml. Elles ont alors été utilisées pour la production ou l'isolement viral.

### **2.1.3.2 Cellules immunitaires**

Les cellules immunitaires ont été isolées du thymus, de la rate et de la moëlle osseuse de poussins âgés de 1 et 7 jours, dans des conditions stériles selon les techniques courantes de prélèvement. Les organes prélevés tels que la rate et le thymus ont été dissociés par frottement sur un treillis de 70µm (Fischer Scientific, Montréal, Canada) et les cellules isolées ont été recueillies par lavage du treillis avec 10ml d'un milieu de culture composé de RPMI 1640 (GIBCO Laboratories) supplémenté de 20% de SVF, des antibiotiques (pénicilline et streptomycine) et de la L-glutamine (GIBCO Laboratories). Les cellules de la moëlle osseuse ont été obtenues par injection de RPMI 1640 avec 5% SVF dans la partie centrale des fémurs après que les épiphyses aient été enlevées. Les suspensions cellulaires de rate, ont été enrichies par passage sur un gradient de Lymphoprep (Fisher Scientific, Montréal) suivi d'une centrifugation de 10 minutes à 2500 rpm. Alors, les cellules présentes dans l'anneau à l'interface du gradient ont été prélevées et leur décompte et leur viabilité ont été évalués à l'hémacymètre après une coloration au bleu trypan. Les suspensions cellulaires de rate ont été ajustées à  $1 \times 10^6$  cellules/ml dans du milieu de

culture, ci-haut mentionné (RPMI 1640 + 20%SVF et antibiotiques). Les cellules du thymus, directement après leur extraction, ont été mises en culture à une concentration de  $3 \times 10^6$  cellules/ml. Les cellules de moëlle osseuse isolées des fémurs de poussins ont été mises en culture dans un milieu contenant du RPMI 1640 supplémenté de 5% SVF, d'antibiotiques, du facteur de croissance des colonies de granulocytes et de macrophages murin (GM-CSF) (Peprotech, Ontario, Canada) à une concentration finale de 20ng/ml et d'IL-7 murin (Cedarlane, Ontario, Canada) à une même concentration finale de 20ng/ml.

#### **2.1.4 Infections virales et titrages**

##### **2.1.4.1 Infections des cellules MDCC-CU147.**

Les cellules MDCC-CU147 ont été infectées avec les deux souches virales à une multiplicité d'infection de 0.01 à 0.1 et incubées durant 72 hrs. Le CAV peut atteindre des titres variant entre  $10^5$  à  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/0,1ml dans les cellules MDCC-CU147 (Calnek *et al.* 1999). Après cette période, les cellules ont été dénombrées et les surnageants congelés à  $-80^\circ\text{C}$ . Les surnageants ont été dégelés et recongelés à  $-80^\circ\text{C}$  et subséquemment dégelés, aliquotés et recongelés. Un contrôle de cellules non-infectées mais similairement traitées a systématiquement été ajouté à toutes les expériences, comme témoin du surnageant cellulaire.

Les virus présents dans les surnageants ont été titrés selon la méthode de dilution limite sur des cellules MDCC-CU147 non-infectées. Différentes dilutions décimales (non-dilué,  $10^{-1}$  à  $10^{-7}$ ) ont servi à infecter des cellules MDCC-CU147 ( $3 \times 10^5$ /puit). Cette infection a été d'une durée de 72hrs d'incubation à  $39^\circ\text{C}$  en présence de 5% CO<sub>2</sub>. Chacune des dilutions a été inoculée dans trois puits de cellules. Après 72 hrs, les cellules infectées avec chacune des dilution ont été centrifugées et resuspendues dans un milieu à cyto-centrifugation. Pour ce faire, les suspensions cellulaires (environ  $2.5 \times 10^5$  cellules) ont été cyto-centrifugées à 1300rpm durant 5

min sur une lame de microscope préalablement enduite d'un milieu d'adhérence (Albumine Bovine (BSA) 2% dans du PBS) (Cytospin, Shandon). Les lames cytocentrifugées ont été fixées à l'aide de formaldéhyde 4% durant 1hre suivi d'un lavage dans du PBS. La détection des protéines virales intracytoplasmiques fut effectuée par un test d'immunoperoxydase indirecte sur cellules cytocentrifugées. Une dilution optimale d'un antisérum de poulet anti-CAV a été ajouté sur le spot de cellules sur la lame suivie d'une incubation de 30min à la température de la pièce. Après deux lavages dans du PBS à pH 7.2, une dilution optimale d'un anti-IgG de poulet couplé à la peroxydase a été déposé sur chaque lame et incubé à la température de la pièce durant 30minutes. Après deux lavages, une solution de peroxyde a été ajoutée en même temps qu'un révélateur. Des lames contrôles de cellules non-infectées et/ou traitées avec le surnageant de cellules contrôles, ou de cellules seulement marquées avec l'anti-IgG de poulet ont été ajoutées. Les lames ont été examinées en microscopie à fluorescence (Dialux 22, Leitz, Montréal, Qué. Canada). Le titre viral a été évalué par la dernière dilution où 50% des puits ont montré des cellules infectées par le virus.

#### **2.1.4.2 Infections virales des cellules lymphoïdes ou myéloïdes et des macrophages**

L'infection des cellules en provenance des divers organes de poussins a été effectuée à une multiplicité d'infection de 0.1 à 1. Environ,  $1 \times 10^6$  cellules lymphoïdes de rate ou  $3 \times 10^6$  de thymocytes ou  $2 \times 10^6$  cellules de moëlle osseuse ont été mises en contact avec la suspension virale, dans un volume final de 200µl. Des cellules contrôles ont reçu un volume similaire du surnageant de cellules MDCC-CU147 non-infectées. Les cellules ont été incubées à 39°C durant des temps d'incubation variant de 1 à 3 jours selon les protocoles expérimentaux.

### 2.1.4.3 Détection d'ADN viral par PCR

La réplication virale a été détectée par la présence d'ADN viral codant pour la protéine VP3, par un test PCR. Les cellules de chaque organe lymphoïde ont été infectées *in vitro* avec les virus CUX-1 ou CIA-1 durant 24 heures et lavées au RPMI 1640 à deux reprises. Les cellules ont ensuite été remises en culture durant une période supplémentaire de 48 heures et les surnageants récoltés et congelés à -80°C. Ces surnageants ont alors été utilisés pour la détection de l'ADN viral.

Dans un premier temps l'extraction de l'ADN a été effectué avec du DNAzol (Invitrogen, Burlington, Canada) durant 45 minutes sous agitation. L'ADN a été précipité à l'aide d'éthanol 100% et d'une centrifugation de 15min à 11000 rpm. Après avoir jeté le surnageant, le culot a été lavé avec de l'éthanol à 70% et recentrifugé durant 5min à 11000 rpm. Le surnageant fut jeté et le culot a été suspendu dans une solution de NaOH (8mM).

Le mélange à PCR a été effectué dans un tube à PCR avec 1µL d'amorce VP3 (sens) (5'-CGCTCTCCAAGAAGATACTCCAC-3'), 1µL VP3 (Anti-sens) (5'-TATACGCCTTTTTGCGGTTTCG-3') (Invitrogen) (les séquences ont été obtenues selon le génome du CAV fourni par Noteborn *et al.* 1991, dont le numéro d'accension dans *GenBank* est : M55918), 2µL d'une solution de nucléotides 10mM (Ge Healthcare/Bio-sciences, Québec, Canada), 5µL de tampon 10X (Qiagen, USA), 1µL de l'enzyme Taq (Qiagen, Ontario, Canada), 35µL d'H<sub>2</sub>O et 5µL de la solution contenant l'extraction d'ADN à amplifier. Les tubes ont ensuite été mis dans l'appareil à PCR (Perkin Elemer/Gene Amp 2400, MA, USA) avec le cycle adéquat, soit 1 cycle à 95°C durant 5 min, 35 cycles de 1 min à 94°C suivi de 1 min à 54°C et de 0.40 min à 72°C et un dernier cycle de 3 min à 72°C. Ensuite 18µL du produit à PCR a été ajouté à 2µL de bromure d'éthidium (Roche Diagnostics, Laval, Qc, Canada) pour être mis sur gel d'agarose 1,5% (Invitrogen). La migration a été

effectuée sur une plaque à migration (Biorad, Mississauga, Ontario, Canada) à 100Volts durant environ 20min à l'aide d'un 'Power Supply' (Fischer Biotech/Electrophoresis System). Les gels ont été mis sur une plaque à rayons ultraviolets (Bio/Can Scientifique, Montréal, Canada) afin de faire ressortir les bandes et des photos ont été prises à l'aide d'un appareil photo pour les gels (Polaroid DS34).

## **2.2 Techniques d'analyses des divers paramètres immunologiques des cellules lymphoïdes ou myéloïdes et des macrophages.**

Selon les besoins des différents protocoles expérimentaux décrits plus loin, différentes techniques d'évaluation des paramètres immunitaires ont été utilisées.

### **2.2.1 Immunomarquages des différentes sous-populations lymphocytaires.**

L'analyse des sous-populations des lymphocytes T pour chaque organe lymphoïde a été effectuée par cytofluorométrie à l'aide de doubles immunomarquages (1 $\mu$ L pour 1x10<sup>6</sup> cellules) avec des anticorps anti-CD4, anti-CD8, anti-CD3, anti-TCR $\gamma\delta$  de poulet (Southern Biotech, Markham, Ontario, Canada) conjugués à différents fluorochromes (fluorescéine : FITC et phycoérythrine : PE). Les immunomarquages ont été effectués sur les cellules lymphocytaires en provenance du thymus et de la rate, ajustées à une concentration de 10<sup>6</sup> cellules/ml. Ensuite les cellules ont été incubées à 4°C durant 30 minutes, centrifugées et fixées avec une solution de paraformaldéhyde (Sigma Chemicals, Ontario, Canada) à 4% dans du PBS.

Pour les lymphocytes de la rate, des immunomarquages avec les anticorps anti-IgM.FITC et anti-TCR- $\gamma\delta$ .PE ont aussi été effectués, tandis que pour les



macrophages et autres cellules présentatrices d'antigènes de la moëlle osseuse des immunomarquages avec les anticorps anti-IgM.FITC et anti-CD45 ou anti-Ia (CMH II) (Southern Biotech) ont été effectués. Comme les anticorps anti-CD45 et anti-Ia (CHM-II) sont couplés à la biotine, une dilution optimale (1 :100 dans RPMI 1640) de streptavidine-PE a été ajoutée après le premier marquage et les cellules ont été incubées durant 30 minutes à 4°C avant la fixation à la formaldéhyde.

L'acquisition des données en cytofluorométrie a été réalisée à l'aide d'un appareil FACScan (Becton-Dickinson, Oakville, Canada). Pour chaque immunomarquage 10 000 évènements ont été enregistrés. Les régions correspondant généralement aux lymphocytes ou aux macrophages selon les paramètres FSC/SSC (Forward Scatter/Side Scatter) ont été sélectionnées. L'identification des sous-populations lymphocytaires a été obtenue par l'analyse multiparamétrique à l'aide du logiciel CellQuest (Becton-Dickinson).

### **2.2.2 Détection d'apoptose et de nécrose par un simple ou un double immunomarquage TUNEL/Annexine V.**

L'apoptose et la nécrose cellulaire suite aux infections virales ont été mises en évidence par des techniques de simple marquage des oligonucléosomes utilisant le test TUNEL (Roche Diagnostics, Québec, Ca) et par des doubles immunomarquages utilisant le test Annexine V/ Iodure de propidium (Roche Diagnostics), et ce, sur des cellules en suspension, tels que des lymphocytes, ou des cellules adhérentes, tels que les macrophages et les cellules myéloïdes. Le test TUNEL permet de détecter les oligonucléosomes suite à la réaction de l'endonucléase tandis que le test Annexin V/Iodure de propidium permet d'évaluer la translocation des phospholipides membranaires et la dégradation de l'ADN.

Ainsi, pour le test TUNEL, les cellules précédemment infectées par le CAV ou non-infectées ont été lavées avec une solution de PBS avec 1% d'albumine bovine (BSA) à 4°C et ensuite ajustées à une concentration de  $1 \text{ à } 2 \times 10^7$  cellules/ml. Dans une plaque de 96 puits, environ  $1 \times 10^6$  cellules ont été déposées par puit et les cellules ont été fixées par une solution de paraformaldéhyde 4% dans du PBS. Après une incubation 60 min à la température de la pièce, la plaque a été centrifugée à 1300rpm durant 10min et les cellules lavées avec du PBS avec 1% de BSA à 4°C. Ensuite les cellules ont été perméabilisées à 4°C durant 2min avec l'ajout d'une solution composée de Triton X-100 (0,1%) dans du citrate de sodium (0,1%). Après le lavage des cellules, la solution de réaction TUNEL a été ajoutée et la plaque a été incubée durant 60min à 37°C et à l'obscurité. Finalement les cellules ont été lavées à deux reprises et resuspendues dans une solution de PBS pour être analysées à l'aide d'un cytofluoromètre (Becton-Dickinson). Les données ont été traitées pour une analyse multiparamétrique par le logiciel CellQuest (Becton-Dickinson).

Par ailleurs, le test d'Annexin V/Iodure de propidium a été effectué sur des cellules lavées avec du PBS et ajustées à une concentration d'environ  $1 \times 10^6$  cellules/ml dans une solution tampon d'Annexin V (composée de 10mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140mM NaCl et 2,5mM  $\text{CaCl}_2$ ). Ensuite, les cellules ont été aliquotées à un volume de 100µL/tube où 5µL d'Annexin V-FITC et 10µL d'iodure de propidium ont été ajoutés. Les tubes contenant les cellules ont été incubés durant 15 minutes à température de la pièce et à la noirceur. Enfin, du tampon d'Annexin V a été ajouté avant d'analyser les cellules à l'aide d'un cytofluoromètre (Becton-Dickinson). Une analyse multiparamétrique par le logiciel CellQuest (Becton-Dickinson) a été effectuée sur les cellules marquées. Les cellules Annexine V+/IP- ont été considérées en apoptose précoce, les cellules AnnexinV+/IP+ sont en apoptose avancée alors que les cellules Annexin V-/IP+ ont été considérées en nécrose.

### 2.2.3 Évaluation fonctionnelle des lymphocytes

La réponse des lymphocytes, infectés durant 72 heures ou non infectés, à la stimulation par des mitogènes a été évaluée à l'aide du niveau d'activité des déshydrogénases mitochondriales par l'ajout de MTS/PMS (sels de tétrazolium/phénazine méthosulfate) (Promega, WI, USA). Les tests de transformation blastique ont été effectués sur des lymphocytes mis en culture dans du RPMI 1640 additionné de 20% de SVF (Gibco Laboratories) et de 2-mercaptoéthanol (Sigma, Ontario, Canada) avec des concentrations de 15µg/ml et 30µg/ml de concanavaline A (ConA) (Sigma). Après une incubation de 24heures, l'activité blastogénique a été relevée par l'ajout de MTS/PMS et pour une période jusqu'à 96 h. La densité optique des surnageants a été évaluée à 490nm avec un colorimètre adapté pour les cellules en culture (lecteur de plaques Emax) (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Des contrôles de cellules non-stimulées, de cellules stimulées mais non-infectées ont été ajoutés et les niveaux de transformation blastique des lymphocytes infectés ont été comparés à ceux des contrôles. Les tests de transformation blastique ont été effectués en triplicata.

### 2.2.4. Activité phagocytaire des macrophages

Les cellules de moëlle osseuse comprenant les cellules adhérentes et/ou macrophages ont été infectées durant 72 heures sur des plaques non-adhérentes avec les virus CAV. Après l'infection,  $1,5 \times 10^6$  cellules/ml/tube ont été stimulées durant 2 heures avec du lipopolysaccharide (LPS) (Sigma) à 1,25µg/ml. Ces cellules ont ensuite été soumises à un test de phagocytose durant lequel elles ont été mises en présence de billes fluorescentes (FITC) (Polyscience, Niles, IL, USA) de 1,71 µm de diamètre durant une période de 2 h sous agitation dans un bain marie à 39°C et à l'obscurité. Après incubation, les cellules ont été déposées sur un gradient d'albumine bovine à 2% (Sigma) dans du PBS et centrifugées à 1300rpm durant 10min. Le culot

contenant les macrophages ayant phagocyté des billes a été resuspendu dans du PBS. Les expériences ont été effectuées en triplicata.

L'acquisition des données a été effectuée en cytofluorométrie sur un appareil FACScan (Becton-Dickinson). La région correspondant aux macrophages a été sélectionnée selon les paramètres FSC et SSC. Le profil de fluorescence a été alors analysé et chaque pic de fluorescence observée correspondant à une quantité croissante de billes phagocytés M1 (1bille), M2 (2 billes) et M3 (3 billes et plus) a été étudié. L'analyse des pourcentages des macrophages ayant phagocyté 1, 2 et 3 billes et plus a été effectuée à l'aide du logiciel Cell Quest (Becton-Dickinson).

#### **2.2.5 Détection des cytokines.**

Les cytokines sécrétées lors des infections virales ont été détectées par un test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) commercial. Il existe pour le poulet les tests de détection du TGF- $\beta$ 1 et de l'INF- $\gamma$  (Biosource, Québec, Canada). Les suspensions de cellules immunes infectées ont été centrifugées et les surnageants aliquotés et congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pour le test TGF- $\beta$ , les surnageants ont été déposés dans les puits des plaques contenant les anticorps anti-TGF- $\beta$  préalablement adhésés. Ensuite, un anticorps spécifique à la cytokine a été ajouté (anti-TGF- $\beta$ ) conjugué à la biotine. Après plusieurs lavages, de la streptavidine-HRP (peroxydase) a été déposée dans les puits et les plaques incubées 30min à température de la pièce. Après plusieurs lavages avec du PBS, le chromogène Tetraméthyl Benzidine (TMB) (Pharmigen, Ontario, Canada) a été rajouté suivi d'une solution d'arrêt ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (Sigma). La lecture a été effectuée à 490nm dans un lecteur de plaques et les densités optiques obtenues ont été comparées à celle d'une courbe standard effectuée en même temps à partir d'une quantité connue de cytokines. Le même protocole a été utilisé

pour la détection de l'INF- $\gamma$ , sauf que des anticorps de capture ont préalablement été mis dans les puits de la plaque.

### **2.2.6 Analyses statistiques**

Les résultats seront présentés en moyennes et écart-types avec un  $n=3$  seront sous formes d'histogrammes. Le test *t de Student* pairés a été effectué sur les données pairées. Un seuil de  $p<0.05$  a été considéré comme significatif et  $p<0.01$  comme hautement significatif.

# CHAPITRE 3

## RÉSULTATS

### 3.1. Effets *in vitro* du Virus CAV sur les cellules du thymus de poussins

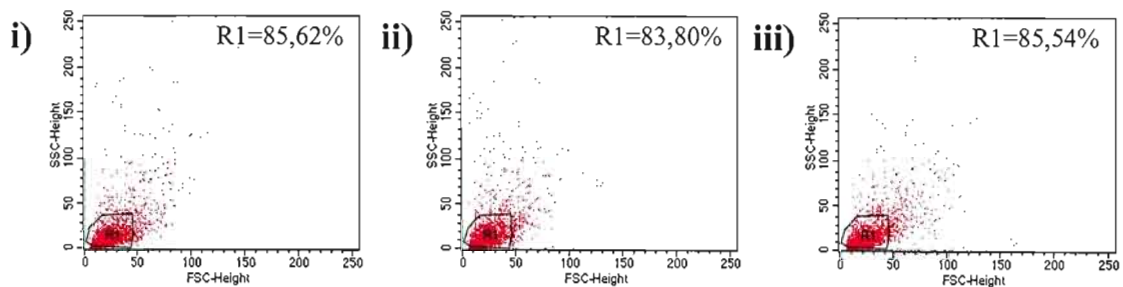
Dans le but de vérifier si les virus CAV peuvent altérer la viabilité et la maturation des thymocytes *in vitro*, plusieurs expériences ont été effectuées à partir de thymocytes isolés de poussins SPF de 1 à 7 jours d'âge ou de thymus de poussins commerciaux de 1 jour dont les progéniteurs avaient reçu une vaccination. Le niveau d'apoptose pouvant être induit par le CAV ainsi que le phénotype des cellules altérées par l'infection ont été analysés.

#### 3.1.1. Poussins SPF de 1 jour

##### 3.1.1.1. Apoptose causée par le CAV

Les thymocytes de poussins SPF sont mis en culture et infectés avec les virus CUX-1 et CIA-1 à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1 pour des périodes de 72hrs. Les cellules sont ensuite marquées par le réactif TUNEL et analysées en cytofluorométrie. Tel que montré dans la Figure 1A, les cellules se retrouvent à un endroit sur le diagramme de distribution où les paramètres FSC et le SSC sont assez faibles. Peu de différences dans les pourcentages des thymocytes dans la région R1 sont observées entre les cellules non-infectées et les cellules infectées par les deux virus (Figure 1A i à iii). L'état apoptotique de ces cellules est confirmé par le test TUNEL où près de 90% de ces cellules sont positives (Fig. 1B i à iii), qu'elles soient infectées ou non. L'analyse de trois expériences similaires montrent que le pourcentage de cellules TUNEL+ a tendance à diminuer en présence du virus CIA-1, mais cet effet n'est pas significatif (Fig. 2). Par contre, la mise en culture des thymocytes de poussins SPF de 1 jour les rend très sensibles à l'apoptose spontanée, tel que montré par le fort pourcentage de cellules TUNEL+.

### A) FSC/SSC



### B) TUNEL

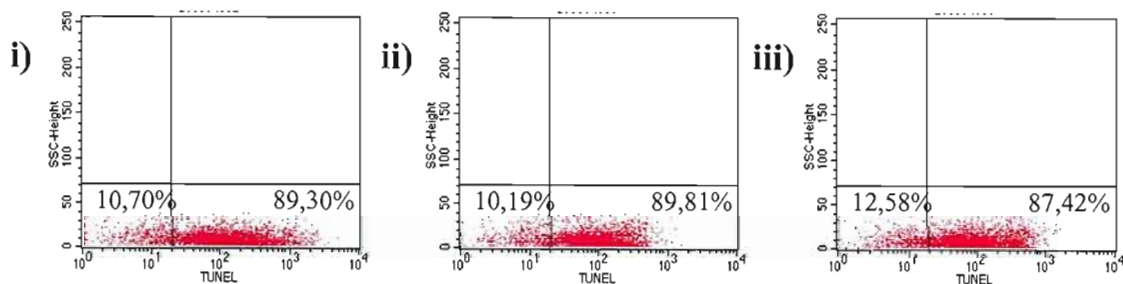


Figure 1: (A) Analyse FSC/SSC des thymocytes de poussins SPF de 1jr après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii) comparée aux cellules contrôles (i) et (B) pourcentages des cellules TUNEL positives dans la région sélectionnée.

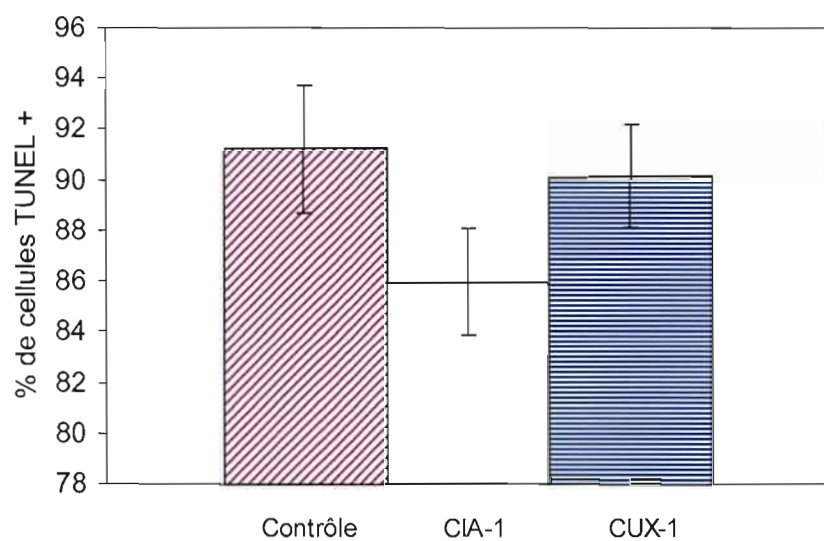


Figure 2: Pourcentages des thymocytes TUNEL+ de poussins SPF de 1jr après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 et CIA-1 comparés aux cellules contrôles.

Expérience réalisée en triplicata.



### 3.1.1.2. Analyse phénotypique des sous-populations thymiques

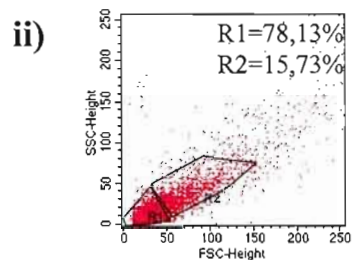
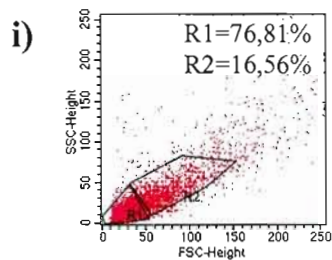
#### 3.1.1.2.1. Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD4/CD8 infectées par le CUX-1 et CIA-1.

Afin de vérifier si une ou plusieurs populations thymiques sont affectées par l'infection virale, des thymocytes de poussins d'un jour SPF sont infectés *in vitro* par les virus CUX-1 et le CIA-1 et incubés pour une période de 72hrs, en utilisant le surnageant des cellules MDCC comme contrôle (ou cellules non-infectées). Les thymocytes sont alors lavés et immunomarkés avec du CD4-FITC / CD8-PE et analysés en cytofluorométrie.

Une première expérience est effectuée avec des thymocytes infectés par la souche CUX-1 du virus CAV. La figure 3A montre l'analyse FSC/SSC de ces cellules où deux groupes de cellules différant par leur FSC/SSC sont observées. Les cellules de la région R2 possèdent une taille (FSC) et une granulosité (SSC) plus fortes que celles de la région R1. Il y a peu de différence dans les pourcentages de cellules dans chacune de ces régions entre les cellules non-infectées (i) et infectées par le virus CUX-1 (ii).

L'analyse multiparamétrique des cellules de ces deux régions révèle plusieurs sous-populations en fonction de l'intensité de l'expression des marqueurs CD4 et CD8. Ainsi, des cellules ayant un FSC/SSC élevé (région R2) montrent les phénotypes CD4+CD8<sup>high</sup>, CD4+CD8<sup>low</sup> et CD4+CD8-, autant chez des cellules infectées que non-infectées (Figs 3Bi et 3Bii). Les cellules des phénotypes CD4-CD8<sup>high</sup> ou CD4-CD8<sup>low</sup> sont peu représentées dans cet échantillon. Les cellules ayant un FSC/SSC faible (région R1) montrent la présence de tous les phénotypes, mais ceux qui y sont en plus grand pourcentage sont les CD4-CD8- et CD4+CD8<sup>high</sup> (Figs 3Biii et Biv). Les cellules ayant le phénotype CD4-CD8<sup>low</sup> et CD4-CD8<sup>high</sup> sont présentes en moins grand pourcentage, mais la présence virale induit une baisse

### A) FSC/SSC



### B) Marquages CD4/CD8

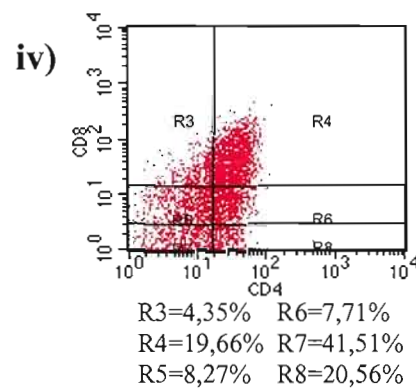
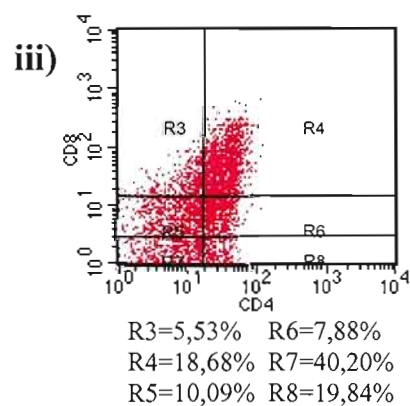
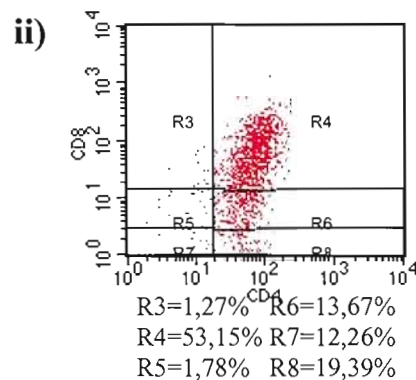
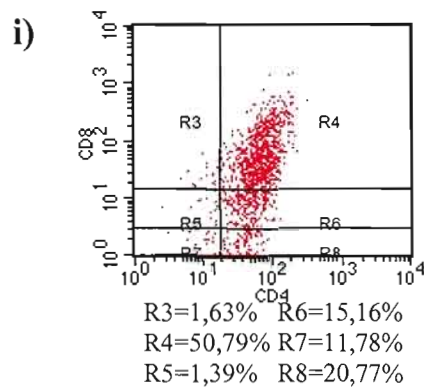
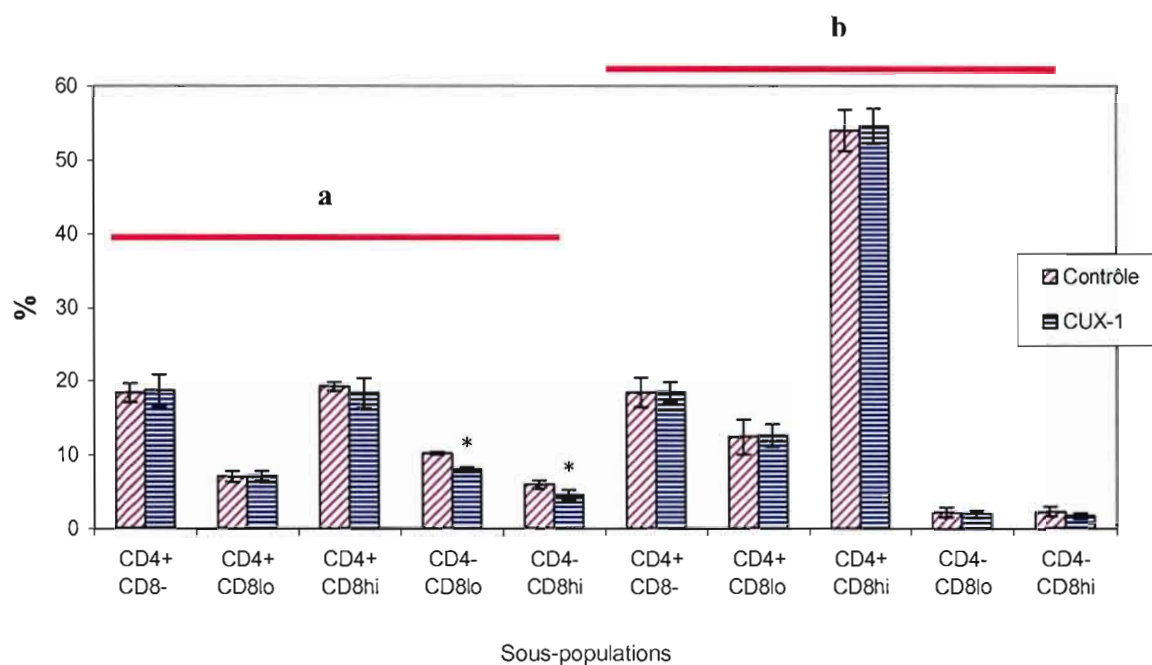


Figure 3 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par le virus CUX-1 (ii) et analyse phénotypique des différentes sous populations CD4/CD8 (B) pour les thymocytes normaux R2 (i et ii) et apoptotiques R1 (iii et iv), non-infectées (i et iii) et infectés (ii et iv).



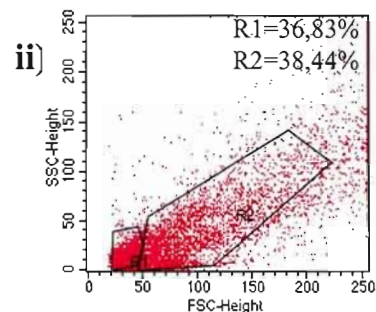
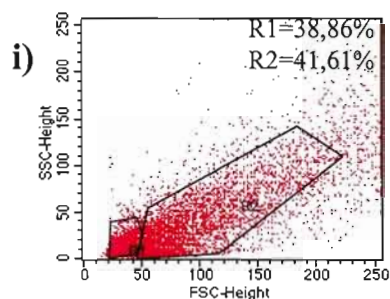
\*  $p < 0.05$

significative de la sous-population  $CD4-CD8^{high}$  (Fig. 4a). Par contre, la présence de virus n'engendre pas de variation observable des autres sous-populations (Fig. 4b).

La deuxième expérience a été réalisée avec la souche virale CIA-1. L'analyse FSC/SSC des populations cellulaires montre, comme dans la Fig. 3A deux régions R1 et R2 (Fig. 5A). Peu de différence sont observées dans les pourcentages de R1 et R2 entre les cellules non-infectées (i) et infectées (ii).

L'analyse multiparamétrique des cellules provenant de la région R2, a permis d'observer que les principales sous-populations présentes sont les cellules  $CD4+CD8^{high}$  et  $CD4+CD8^{low}$  (Figs 5Bi et 5Bii). Aucune différence entre les pourcentages des cellules non-infectées et infectées n'est mise en évidence (Fig. 6b). Une forte présence des phénotypes  $CD4+CD8^{low}$  et  $CD4+CD8^{high}$  est observée parmi les cellules de la région R1 (Figs 5Biii et 5Biv), mais aucune différence significative entre les cellules non-infectées et infectées n'est détectée (Fig 6a).

### A) FSC/SSC



### B) Marquages CD4/CD8 (CIA-1)

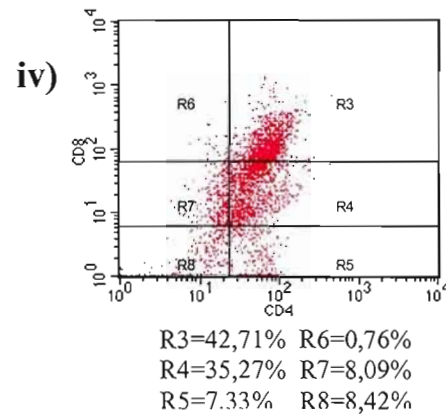
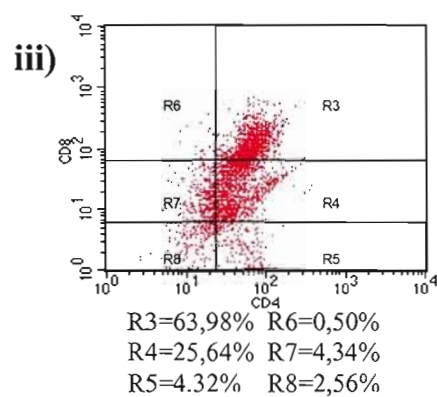
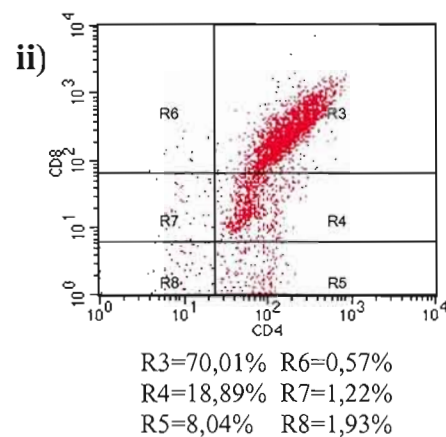
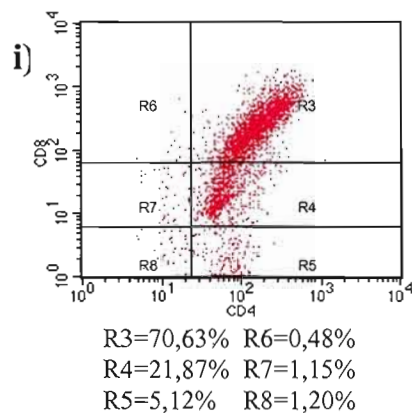


Figure 5 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées avec le virus CIA-1 (ii) et analyse phénotypique des différentes sous populations CD4/CD8 (B) pour les thymocytes normaux R2 (i et ii) et apoptotiques R1 (iii et iv), non-infectées (i et iii) et infectés (ii et iv).

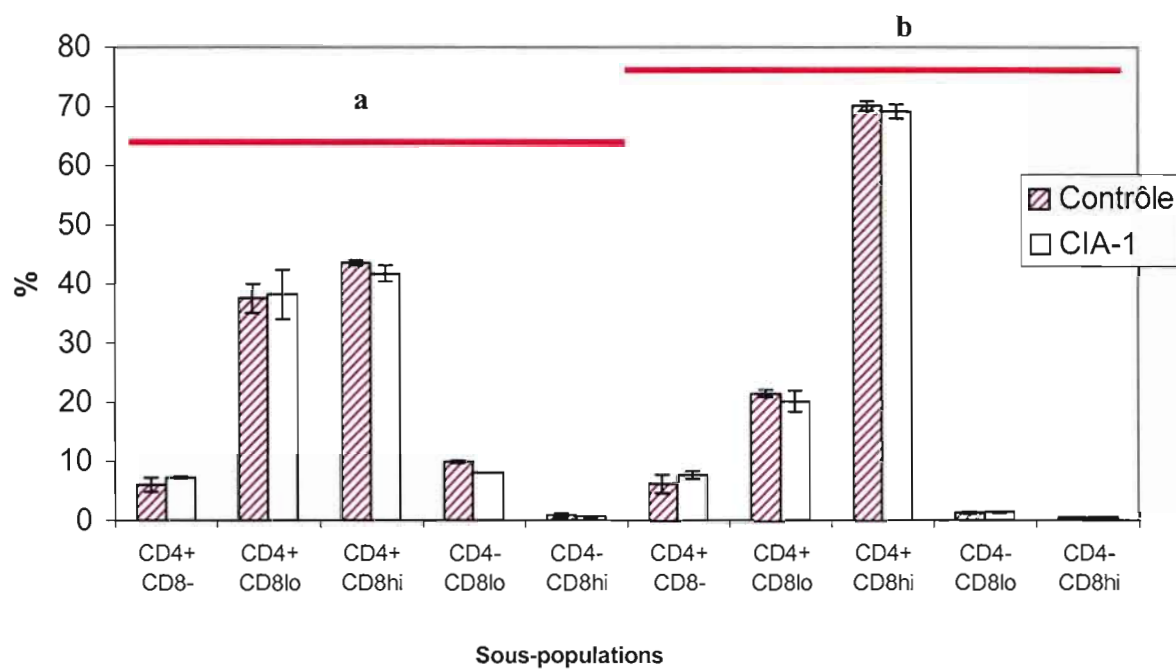


Figure 6: Pourcentages des différentes sous-populations thymiques CD4/CD8 non-infectées et infectées par le CIA-1, localisées dans les régions R1 (a) et R2 (b). Expérience réalisée en triplicata.

### 3.1.1.2.2. Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD3/CD8 infectées par le CUX-1 et le CIA-1

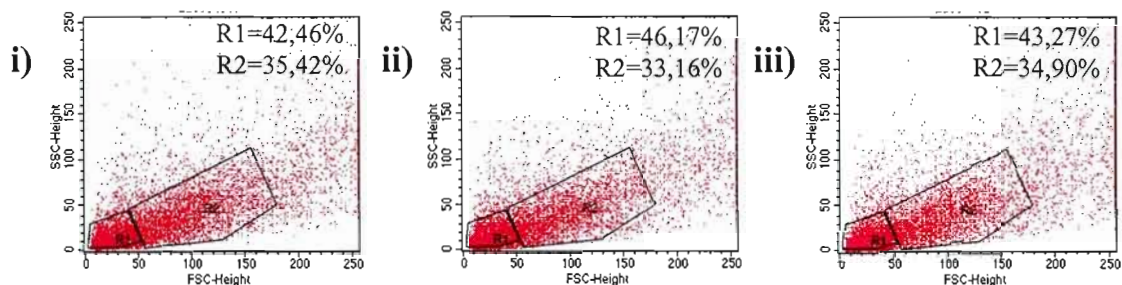
Afin de vérifier plus précisément le phénotype de cellules CD8 affectées par l'infection du CAV, des thymocytes de poussins SPF d'un jour sont infectés *in vitro* par les virus CUX-1 et le CIA-1 et incubés pour une période de 72hrs, en utilisant le surnageant des cellules MDCC comme contrôle (ou cellules non-infectées). Les thymocytes sont alors lavés et immunomarqués avec du CD3-FITC / CD8-PE et analysés en cytofluorométrie.

L'analyse FSC/SSC révèle deux groupes de cellules différant par leur FSC/SSC (Fig. 7A). Les cellules de la région R2 possèdent une taille (FSC) et une granulométrie (SSC) plus fortes que celles de la région R1. Il y a peu de différence dans les pourcentages de cellules dans chacune de ces régions entre les cellules non-infectées (i) et infectées par les virus CUX-1 (ii) ou le CIA-1 (iii).

L'analyse multiparamétrique des cellules de ces deux régions montre plusieurs sous-populations en fonction de l'intensité de l'expression des marqueurs CD3 et CD8. Ainsi, des cellules ayant un FSC/SSC élevé (région R2) montrent principalement les phénotypes CD3+CD8<sup>high</sup>, CD3+CD8<sup>low</sup>, CD3+CD8- autant chez les cellules non-infectées qu'infectées par les virus CUX-1 et CIA-1 (Figs 7Bi, ii et iii). Les cellules des phénotypes CD3-CD8<sup>high</sup> ou CD3-CD8<sup>low</sup> sont peu représentées dans cet échantillon. Les cellules ayant un FSC/SSC faible (région R1) montrent la présence de tous les phénotypes, mais principalement le phénotype CD3-CD8<sup>low</sup> (Figs 7Biv, v et vi). La présence des virus CUX-1 amène une baisse significative ( $p < 0.05$ ) de la sous-population CD3-CD8<sup>low</sup> (Fig. 8a). Par contre, la présence de virus n'engendre pas de variation significative des autres sous-populations (Fig. 8b).



### A) FSC/SSC



### B) CD3/CD8

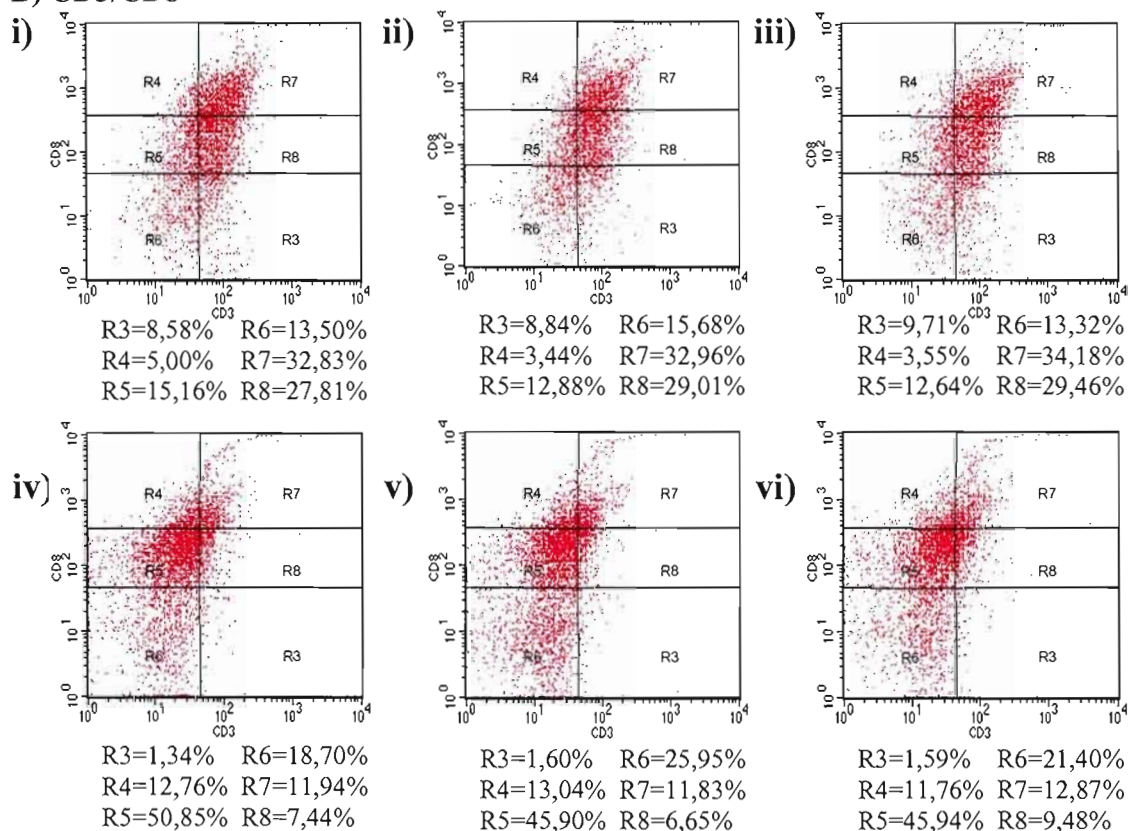


Figure 7 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches virales CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), et analyse phénotypique des différentes sous populations CD3/CD8 (B) pour les thymocytes normaux R2 (i, ii et iii) et apoptotiques R1 (iv, v et vi), non-infectées (i et iv) ou infectés par le CUX-1 (ii et v) et par le CIA-1 (iii et vi).



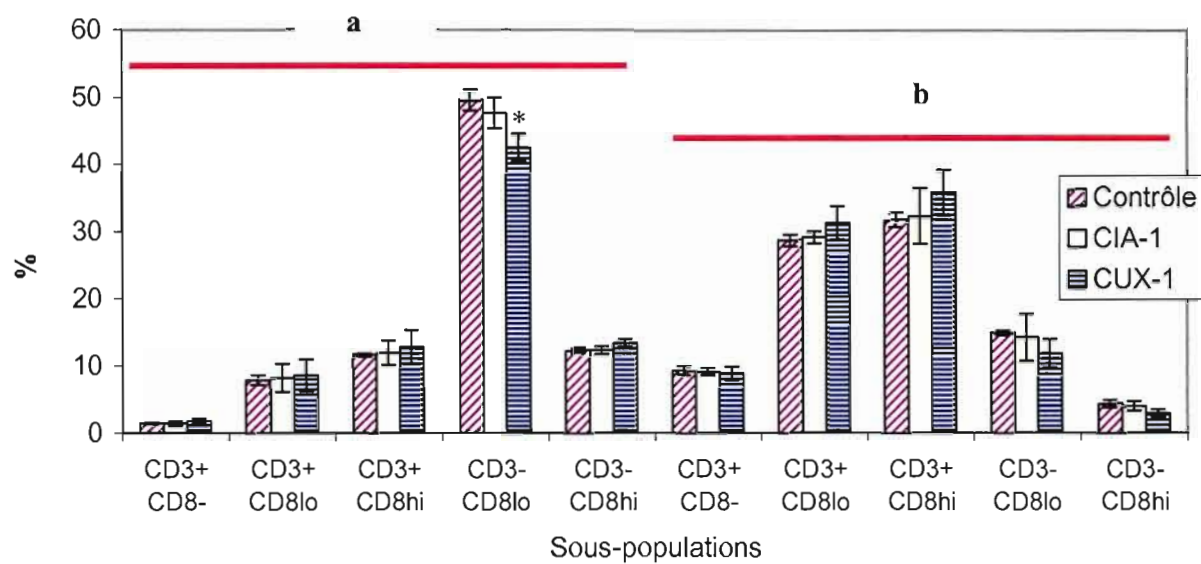


Figure 8: Pourcentages des différentes sous-populations CD3/CD8 pour les thymocytes non-infectés et infectés par les virus CUX-1 et CIA-1 et localisés dans les régions R1 (a) et R2 (b). Expérience réalisée en triplicata.

\*  $p < 0.05$

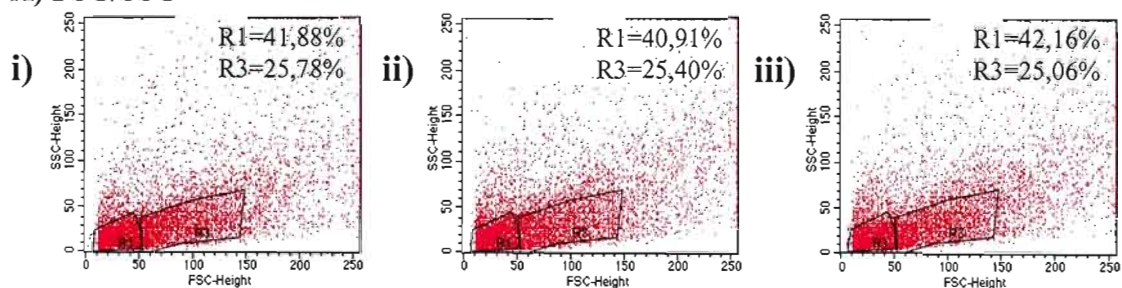
### 3.1.1.2.3. Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD3/TCR $\gamma\delta$ infectées par le CUX-1 et le CIA-1

La baisse du pourcentage des cellules CD3-CD8<sup>low</sup> observée en présence du virus CUX-1 suggère que ces pourraient exprimer un TCR différent au TCR $\alpha\beta$  laissant place au TCR $\gamma\delta$ . Afin de vérifier cette hypothèse, des thymocytes de poussins d'un jour SPF sont infectés *in vitro* par les virus CUX-1 et le CIA-1 et incubés pour une période de 72hrs, en utilisant le surnageant des cellules MDCC comme contrôle (ou cellules non-infectées). Les thymocytes sont alors lavés et immunomarqués avec du TCR $\gamma\delta$ -FITC / CD3-PE et analysés en cytofluorométrie.

L'analyse FSC/SSC révèle deux groupes de cellules différant par leur FSC/SSC (Fig. 9A). Les cellules de la région R3 possèdent une taille (FSC) et une granulosité (SSC) plus fortes que celles de la région R1. Il y a peu de différence dans les pourcentages de cellules dans chacune de ces régions entre les cellules non-infectées (i) et infectées par les virus CUX-1 (ii) ou le CIA-1 (iii).

L'analyse multiparamétrique des cellules de ces deux régions met en évidence plusieurs sous-populations en fonction de l'intensité de l'expression des marqueurs CD3 et TCR $\gamma\delta$ . Ainsi, des cellules ayant un FSC/SSC élevé (région R3) montrent les phénotypes CD3+TCR $\gamma\delta^{\text{low}}$ , CD3+TCR $\gamma\delta^{\text{high}}$  autant chez les cellules non-infectées qu'infectées avec l'un ou l'autre des virus (Figs 9Bi, ii et iii). Les cellules ayant un FSC/SSC faible (région R1) contiennent principalement les cellules de phénotype CD3+TCR $\gamma\delta^{\text{low}}$  suivi d'une présence plus faible des phénotypes CD3-TCR $\gamma\delta^{\text{low}}$  et CD3+TCR $\gamma\delta^-$  (Figs 9 Biv, v et vi). L'infection virale n'entraîne aucune variation significative des sous-populations thymiques dans les deux régions (Fig. 10a).

### A) FSC/SSC



### B) Marquages CD3/TCR $\gamma\delta$

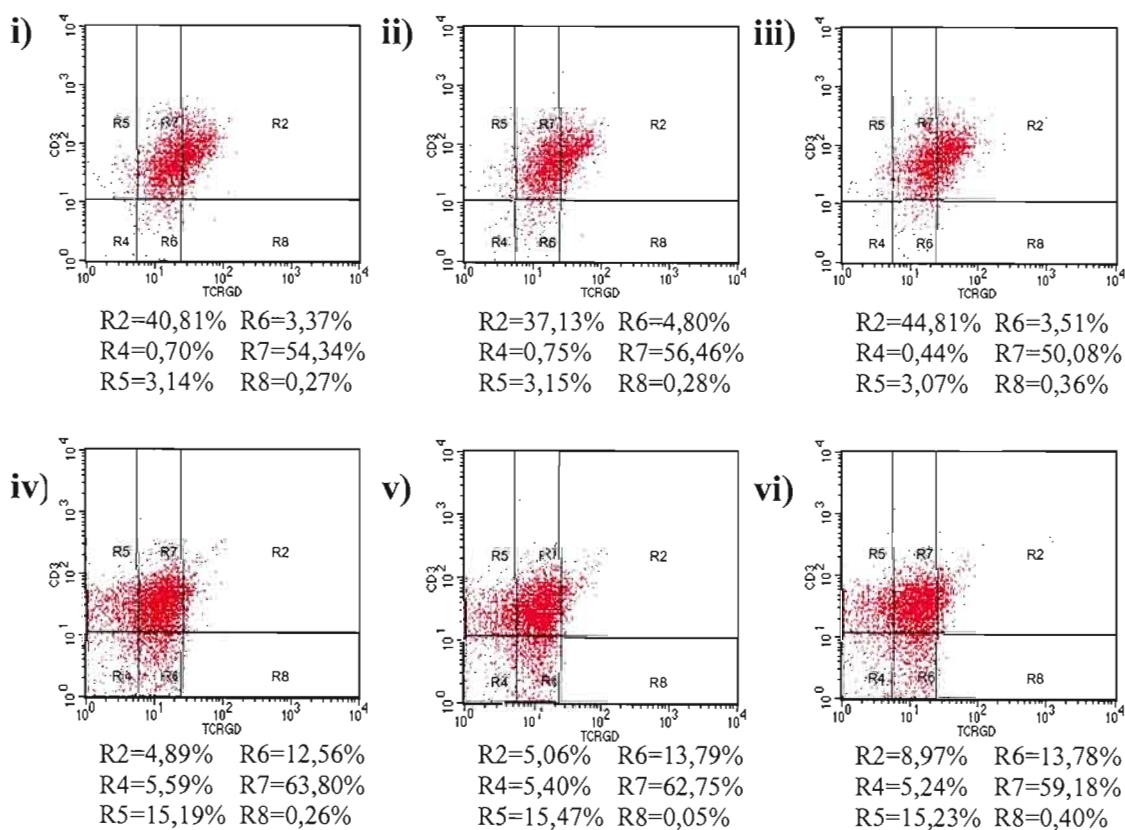


Figure 9 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), et analyse phénotypique des différentes sous populations CD3/TCR $\gamma\delta$  (B) pour les thymocytes normaux R3 (i, ii et iii) et apoptotiques R1 (iv, v et vi) non-infectées (i et iv) ou infectés par le CUX-1 (ii et v) et par le CIA-1 (iii et vi).

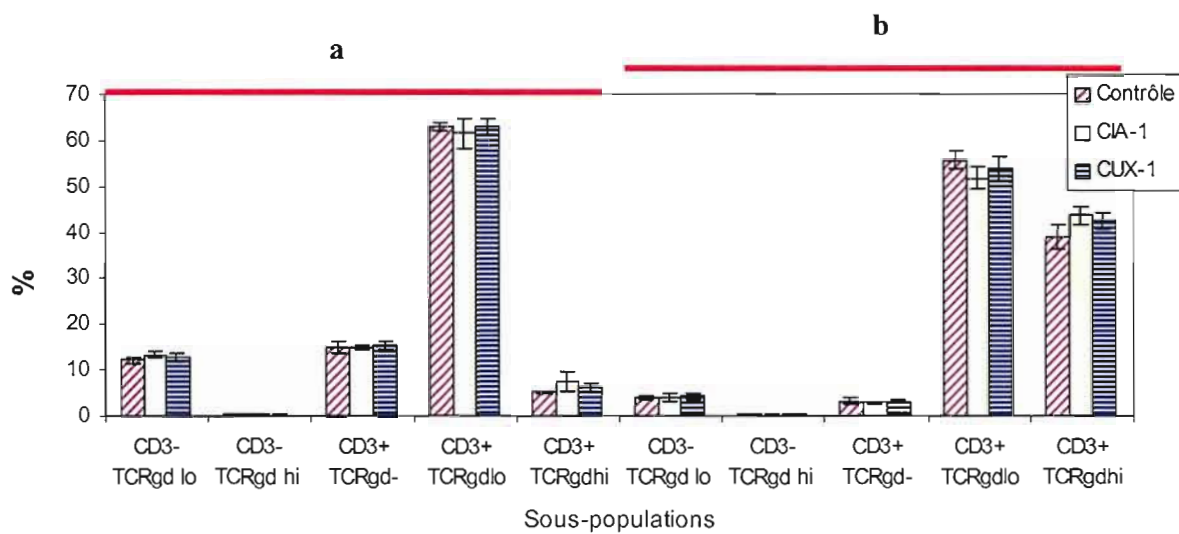


Figure 10 : Pourcentages des différentes sous-populations CD3/TCR $\gamma\delta$  pour les thymocytes non-infectés et infectés par les virus CUX-1 et CIA-1 localisés dans les régions R1 (a) et R3 (b). Expérience réalisée en triplicata.

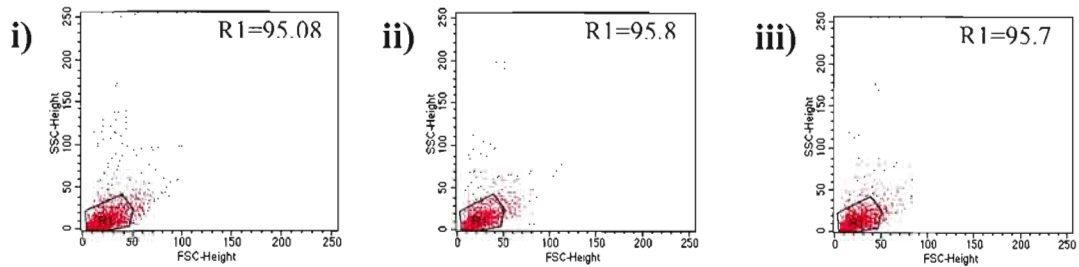
### **3.1.2. Poussins SPF âgés de 7 jours**

#### **3.1.2.1. Apoptose causée par le CAV**

À cause de la faible viabilité des thymocytes de poussins SPF d'un jour des expériences similaires sont réalisées chez des cellules de poussins SPF âgés de 7 jours. Les thymocytes ont été mis en culture et infectés avec les virus CUX-1 et CIA-1 à un multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1 pour une période de 72hrs.

Dans une première expérience les cellules sont marquées par un test TUNEL et analysées en cytofluorométrie. Tel que montré dans la figure 11A, les cellules se retrouvent dans une région de faible FSC et SSC. Peu de différences dans les pourcentages des thymocytes sont observés entre les cellules non-infectées et les cellules infectées par les deux virus (Figs 1A i à iii). L'état apoptotique de ces cellules est confirmé par le test TUNEL où près de 90% de ces cellules non-infectées et infectées se sont avérées positives (Figs 11B i à iii). L'analyse de trois expériences similaires montrent que les pourcentages de cellules TUNEL+ ne varient pas en présence du virus CIA-1 (Fig. 12). Par contre, la mise en culture des thymocytes de poussins SPF de 7 jours les rend aussi très sensibles à l'apoptose spontanée, tel que montré par le fort pourcentage de cellules TUNEL+.

### A) FSC/SSC



### B) TUNEL

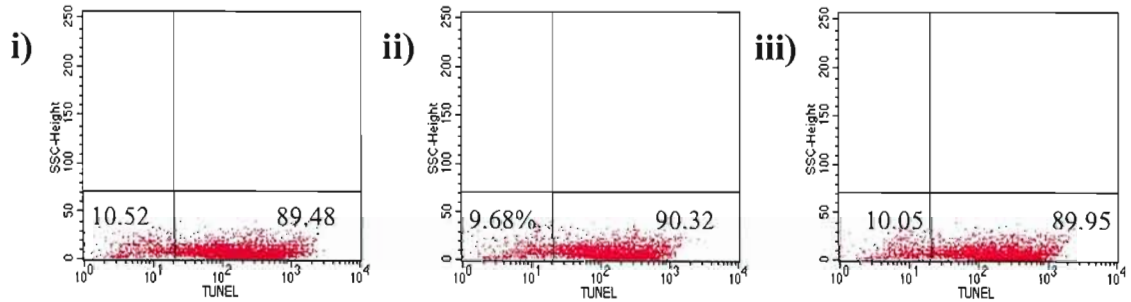


Figure 11: Analyse FSC/SSC (A) des thymocytes de poussins SPF de 7jrs après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii) comparée aux cellules non-infectées (i) et pourcentages des cellules TUNEL positives dans la région sélectionnée (B).

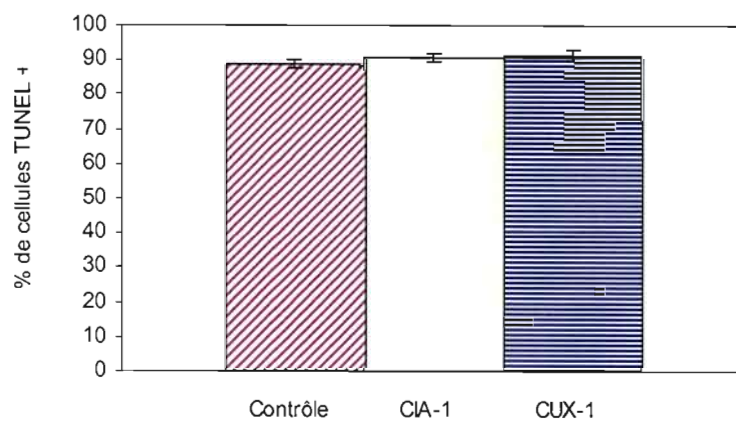


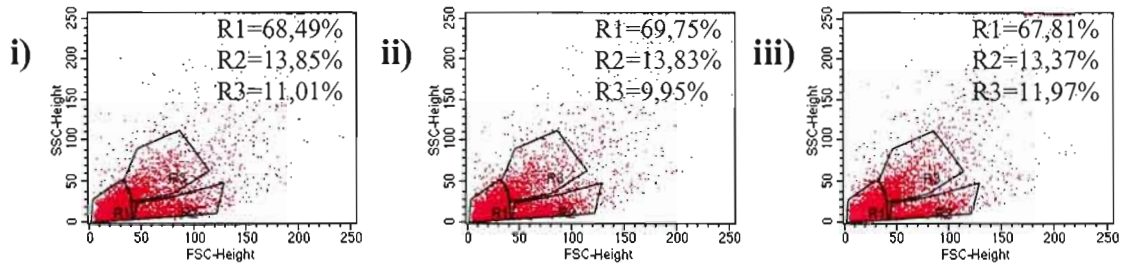
Figure 12: Pourcentages des thymocytes TUNEL+ de poussins SPF 7jrs après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 et CIA-1 comparés aux non-infectés. Expérience réalisée en triplicata.

Dans la deuxième expérience les cellules sont plutôt marquées par de l'Annexin V-FITC et de l'iodure de propidium suivi d'une analyse en cytofluorométrie afin de distinguer les cellules en apoptose précoce et tardive. Ce marquage permet de distinguer trois groupes de cellules ayant des FSC/SSC différents (Fig. 13A). Les cellules ayant un faible FSC/SSC sont représentés par la région R1, les cellules ayant un FSC élevé avec un faible SSC sont représentées par la région R2 et les cellules ayant un FSC plus élevé que R1 mais un SSC plus élevé que R2 sont représentées par la région R3. Il y a très peu de différence dans les pourcentages des cellules non-infectées et de celles infectées par le CIA-1 ou CUX-1 et ce, dans les trois régions (R1, R2 et R3).

Les cellules de la région R2 sont majoritairement non-apoptotiques de par leur phénotype IP-AnnexinV-, mais il y a aussi des cellules en début d'apoptose exprimant le phénotype IP-AnnexinV+, et en apoptose avancé IP+AnnexinV+ (Figs 13 Bi, ii et iii). Dans la région R3, il y a environ 93% des cellules qui sont en apoptose avancée (IP+AnnexinV+) (Figs 13 Biv, v et vi) et dans la région R1 il y a aussi des cellules en apoptose avancé (IP+AnnexinV+) avec une plus grande intensité que celles de la région R3, mais la région R1 contient en plus quelques cellules en début d'apoptose (IP-AnnexinV+) (Figure 13 Bvii, viii et ix). L'observation du phénotype IP+AnnexinV- dans la région R1 correspond à des cellules fragmentées où à des corps apoptotiques où l'ADN est marquée par l'IP. La présence du virus CUX-1 entraîne une augmentation significative des cellules en début d'apoptose (IP-AnnexinV+) ( $p < 0.05$ ) et une baisse très hautement significative des cellules en apoptose avancée (IP+AnnexinV+) ( $p < 0.005$ ). La présence de la souche CIA-1 entraîne aussi une hausse significative des cellules en début d'apoptose ( $p < 0.05$ ) et une diminution significative des cellules en apoptose avancé ( $p < 0.05$ ) (Fig. 14a). La présence de la souche virale CUX-1 cause une augmentation significative du début



### A) FSC/SSC



### B) Annexin V/Iodure de Propidium

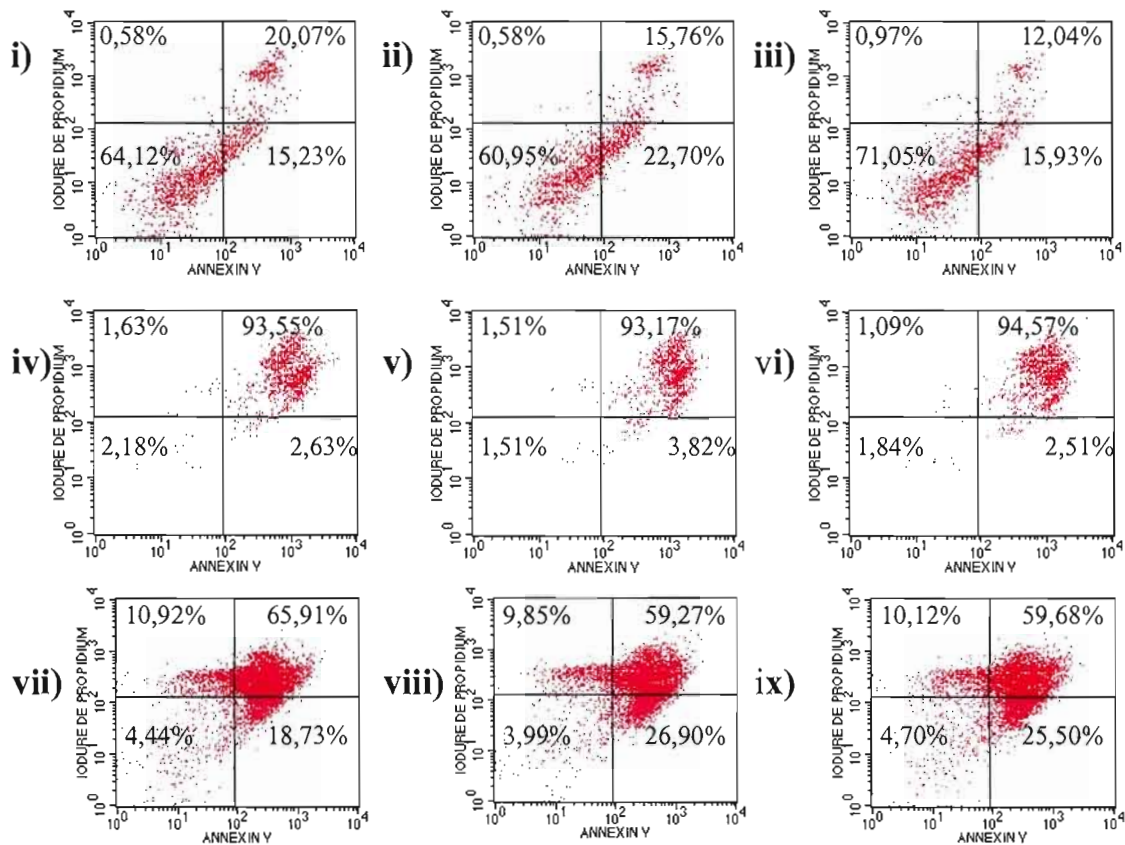


Figure 13 : Analyse FSC/SSC (A) des thymocytes de poussins SPF 7jr après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii) comparés à des cellules non-infectées et analyse multiparamétrique des populations ANNEXIN V/ Iodure de Propidium (B) pour les cellules des régions R2 (i, ii et iii), R3 (iv, v et vi) et R1 (vii, viii et ix) chez des cellules non-infectées (i, iv et vii), ou infectées avec les virus CUX-1 (ii, v et viii) et CIA-1 (iii, vi et ix).

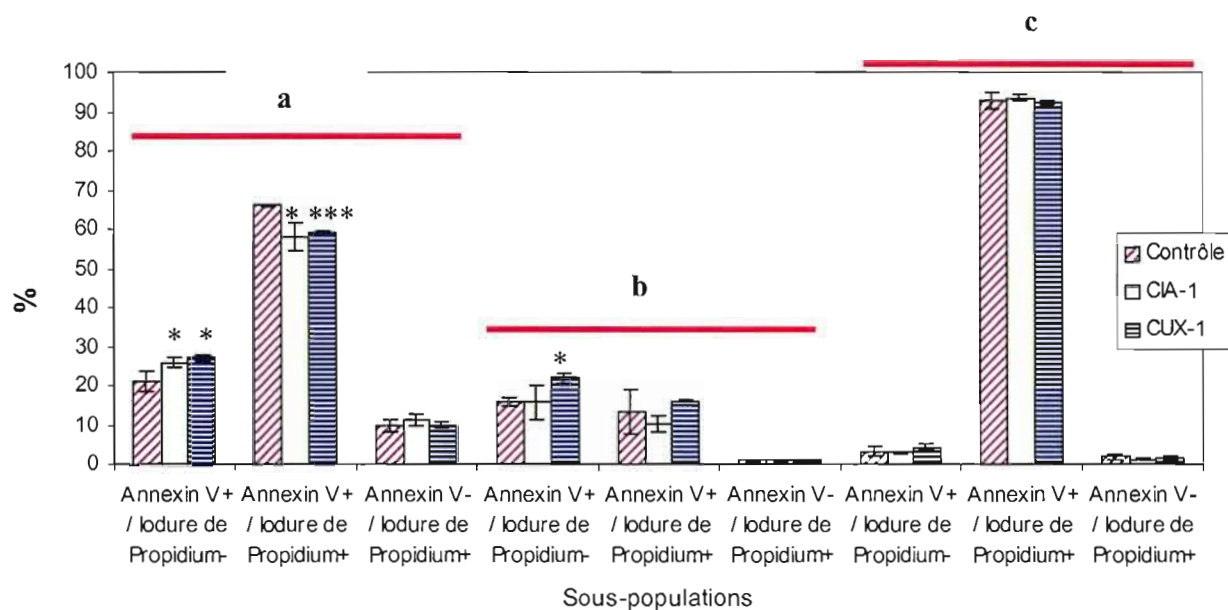


Figure 14: Pourcentages des différentes sous-populations ANNEXIN V/Iodure de Propidium pour les thymocytes non-infectés et infectés par les virus CUX-1 et CIA-1 localisés dans la région R1 (a), R2 (b) et R3 (c). Expérience réalisée en triplicata.

\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.005$

d'apoptose dans les cellules de la région R2 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 14b). Par contre, la présence virale ne cause aucune variation dans les cellules de la région R3 (Fig. 14c).

### **3.1.2.2. Analyse phénotypique des sous-populations thymiques**

#### **3.1.2.2.1. Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD4/CD8 infectées par le CUX-1 et le CIA-1**

Afin de vérifier laquelle ou lesquelles des populations thymiques sont affectées par l'infection virale chez des poussins SPF de 7 jours, des thymocytes sont infectés *in vitro* avec les virus CUX-1 et CIA-1 et incubés pour une période de 72hrs, en utilisant le surnageant des cellules MDCC comme contrôle (ou cellules non-infectées). Les thymocytes sont alors lavés, immunomarqués avec des CD4-FITC / CD8-PE et analysés en cytofluorométrie.

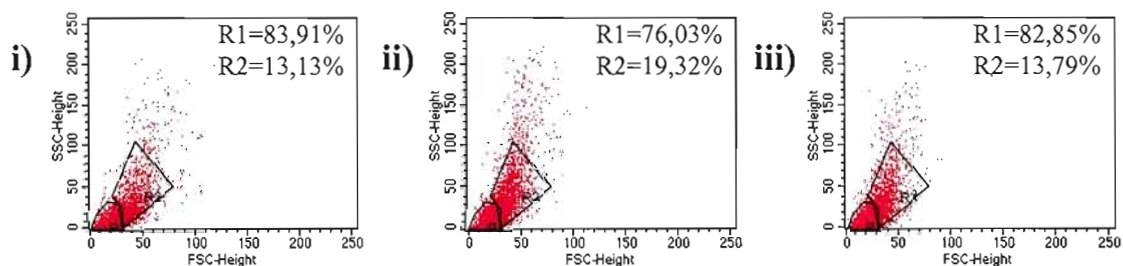
Tel que montré dans la figure 15A (i, ii et iii), l'analyse FSC/SSC de ces cellules révèle deux groupes de cellules différents par leur FSC/SSC. Les cellules de la région R2 possèdent une taille (FSC) et une granulosité (SSC) plus fortes que celles de la région R1. Peu de différences dans les pourcentages de cellules dans chacune de ces régions sont mises en évidence entre les cellules non-infectées et infectées par le CUX-1 et le CIA-1.

L'analyse multiparamétrique des cellules de ces deux régions révèle plusieurs sous-populations en fonction de l'intensité de l'expression des marqueurs CD4 et CD8. Ainsi, chez les cellules ayant un FSC/SSC élevé (région R2), les phénotypes CD4+CD8<sup>low</sup> et CD4+CD8<sup>high</sup> sont les principales sous-populations observées autant chez les cellules non-infectées qu'infectées par les deux virus (Figure 15 Bi, ii et iii). Il n'y a pas de cellules provenant de la région R2 qui montrent les phénotypes CD4-CD8<sup>low</sup> et CD4-CD8<sup>high</sup> et très peu de cellules de phénotype CD4+CD8-. Par contre,

la sous-population CD4+CD8- provenant de la région R2 diminue en présence du virus CUX-1 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 16Ab). Par ailleurs, les principales sous-populations présentes dans la région R1 sont CD4+CD8<sup>high</sup>, CD4+CD8<sup>low</sup> et CD4+CD8- (Figs 15 Biv, v et vi). Cependant, il est possible d'observer qu'en présence de virus CUX-1 il y a une baisse significative de la population CD4+CD8- ( $p < 0.05$ ) et une augmentation très hautement significative de la sous-population CD4+CD8lo ( $p < 0.005$ ) (Fig. 16Aa). Le virus CIA-1 n'entraîne, par contre, aucune variation significative des sous-populations CD4/CD8, malgré une tendance semblable, dans les différentes populations cellulaires, aux variations observées avec le virus CUX-1 (Fig. 16Aa).

L'analyse de l'intensité du marqueur CD8, tel que montré aux figures 16B a et b pour les cellules de la région R1 et celles de la région R2, révèle qu'en présence du virus CUX-1, le CD8 est plus fortement exprimé (Fig. 16Bb).

### A) FSC/SSC



### B) Marquages CD4/CD8

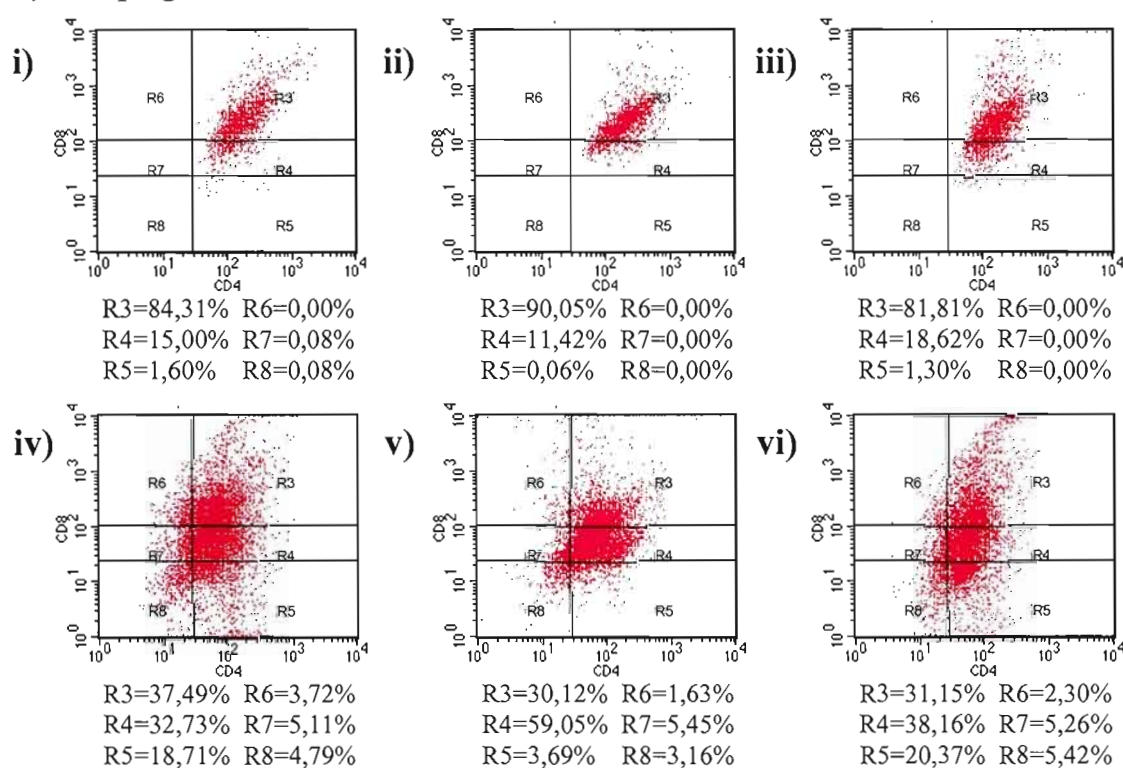
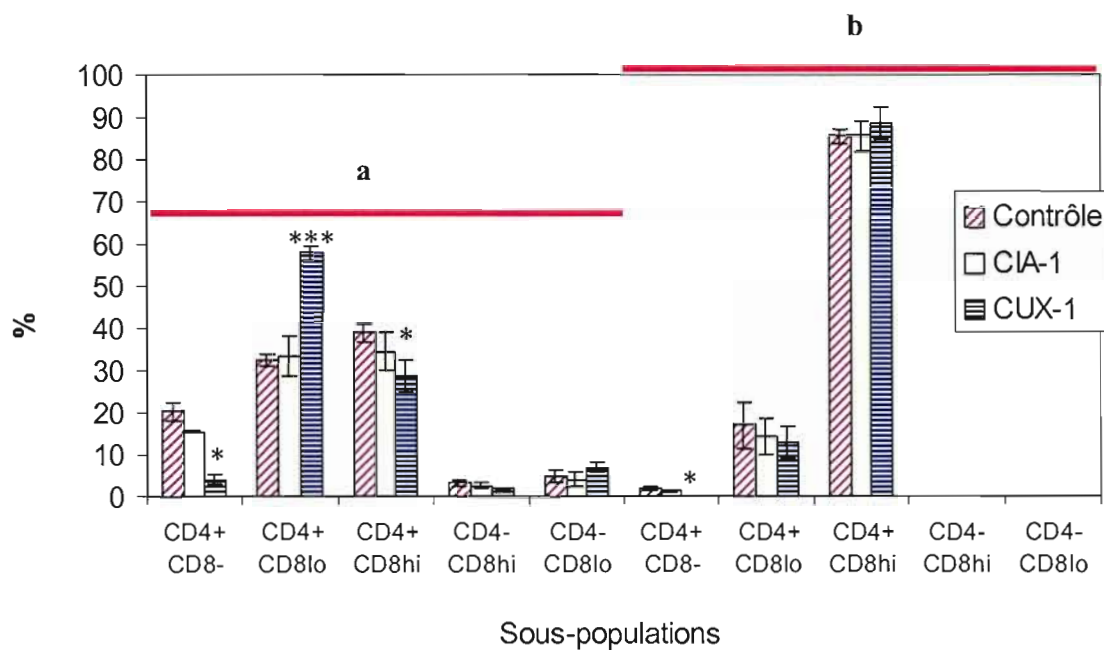


Figure 15 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), et analyse phénotypique (B) des différentes sous populations CD4/CD8 pour les thymocytes normaux R2 (i, ii et iii) et apoptotiques R1 (iv, v et vi), non-infectées (i et iv) et infectés par les virus CUX-1 (ii et v) ou CIA-1 (iii et vi).

A)



B)

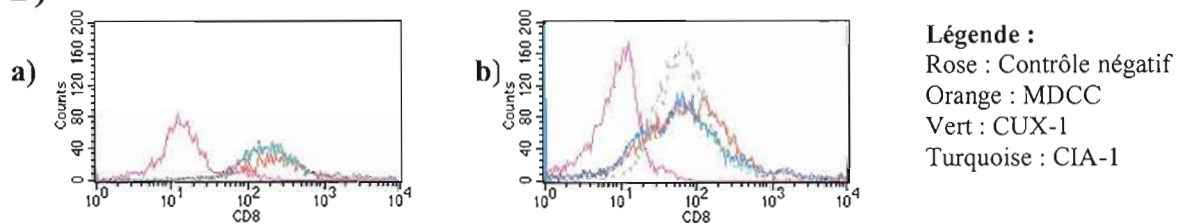


Figure 16 : Pourcentages des différentes sous-populations CD4/CD8 (A) pour les thymocytes témoins et infectés par les virus CUX-1 et CIA-1 apoptotiques (R1) (a) et normaux (R2) (b) et, intensité du marqueur CD8 (B) chez des thymocytes normaux (a) et apoptotiques (b). Expérience réalisée en triplicata.

\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.005$



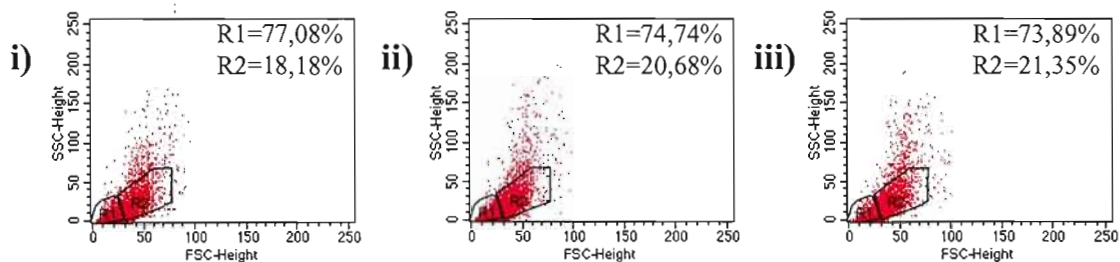
### 3.1.2.2.2. Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD3/CD8 infectées par le CUX-1 et le CIA-1.

Il a été possible d'observer dans la section précédente une baisse des cellules CD8<sup>low</sup>. Afin de caractériser plus précisément le type de sous-population cellulaire CD8 thymique affectée par la présence virale, des thymocytes de poussins de 7 jours SPF sont infectés *in vitro* par le CUX-1 et le CIA-1 et incubés pour une période de 72hrs, en utilisant le surnageant des cellules MDCC comme contrôle (ou cellules non-infectées). Les thymocytes sont alors lavés et immunomarkés avec des CD3-FITC / CD8-PE et analysés en cytofluorométrie.

Tel que déjà observé, l'analyse FSC/SSC a révélé les mêmes deux sous-populations en fonction des paramètres FSC/SSC (Fig. 17A). Encore une fois peu de différences dans les pourcentages des cellules de chacune de ces régions entre les cellules non-infectées et infectées par les virus CUX-1 et le CIA-1 (Figs 17A i, ii et iii).

L'analyse multiparamétrique des cellules de ces deux régions met en évidence plusieurs sous-populations en fonction de l'intensité de l'expression des marqueurs CD3 et CD8. Ainsi, les phénotypes CD3+CD8<sup>low</sup> et CD3+CD8<sup>high</sup> sont les principales sous-populations observées dans la région R2 (FSC/SSC élevés) chez les cellules non-infectées et infectées (Figure 17 Bi, ii et iii). Les cellules CD3 ou CD3+CD8- sont peu représentées dans la région R2. L'ajout des deux virus n'entraîne aucune variation significative chez ces sous-populations (Fig. 18b). Par ailleurs, les différentes sous-populations de la région R1 sont présentes en pourcentages variant environ entre 9% et 36%, sauf pour la sous-population CD3-CD8<sup>high</sup> qui est présente seulement à environ 1% (Figs 17Biv, v et vi). Cependant, il est possible d'observer que la population CD3+CD8<sup>low</sup> est augmentée en présence du virus CUX-1 seulement ( $p < 0.05$ ) (Figure 18a).

### A) FSC/SSC



### B) Marquages CD3/CD8

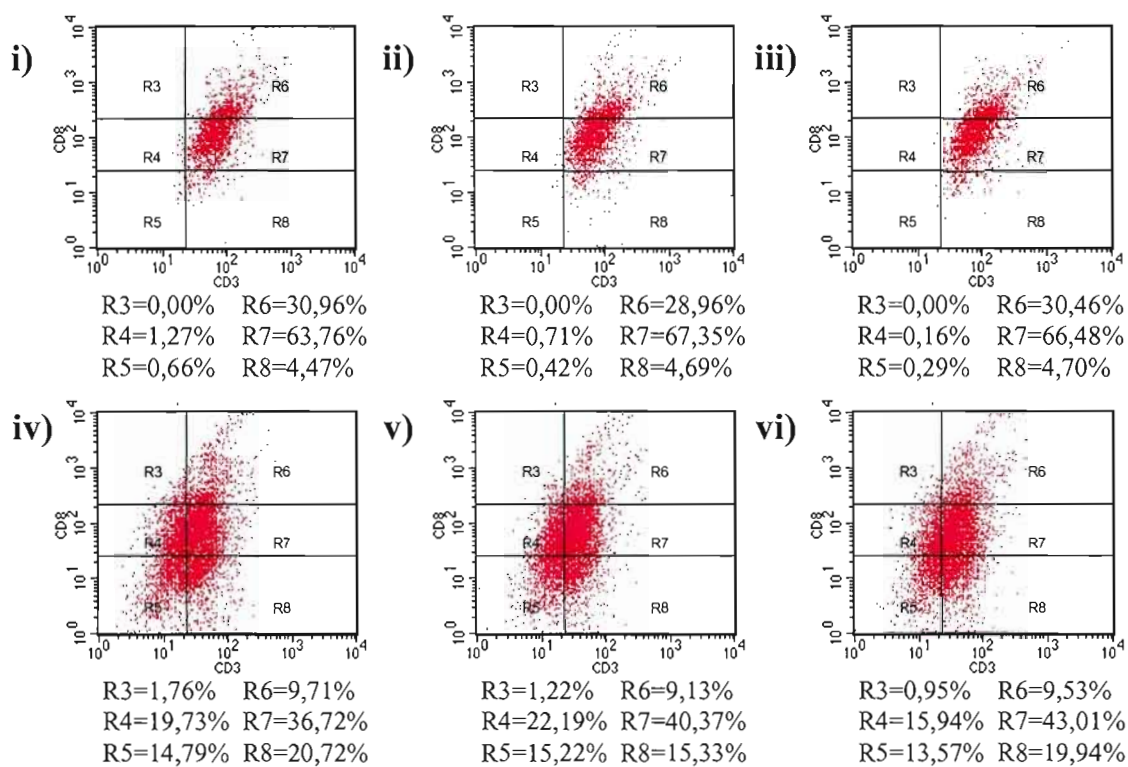


Figure 17 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), et analyse phénotypique des différentes sous populations CD3/CD8 (B) pour les thymocytes normaux R2 (i, ii et iii) et apoptotiques R1 (iv, v et vi), non-infectées (i et iv) et infectés par les virus CUX-1 (ii et v) ou CIA-1 (iii et vi).



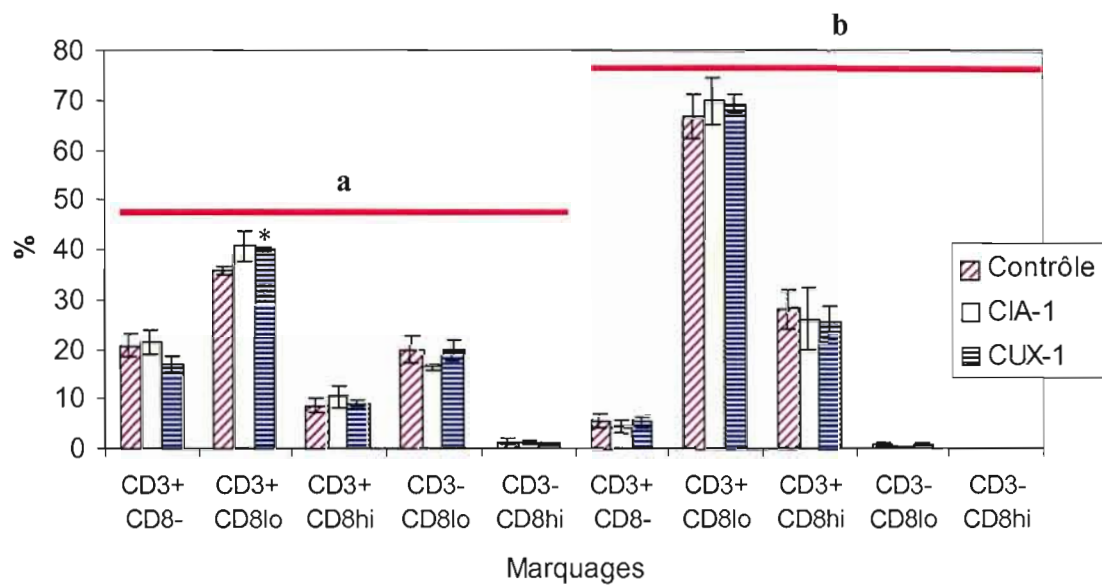


Figure 18 : Pourcentages des différentes sous-populations CD3/CD8 pour les thymocytes témoins et infectés par les virus CUX-1 et CIA-1, apoptotiques (a) et normaux (b). Expérience réalisée en triplicata.

\*  $p < 0.05$

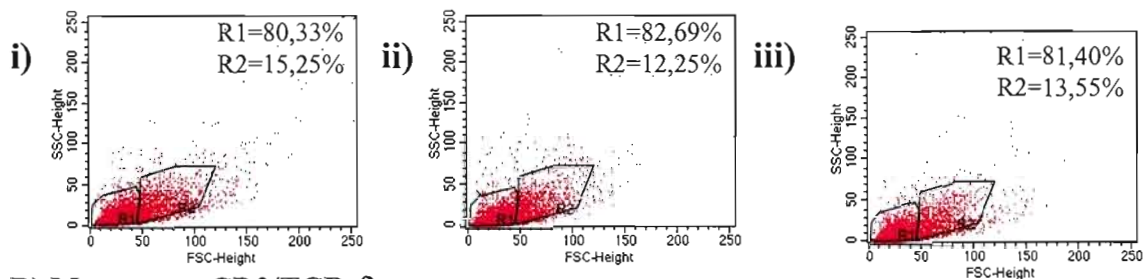
### 3.1.2.2.3. Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD3/TCR $\gamma\delta$ infectées par le CUX-1 et le CIA-1

Il a été possible d'observer d'abord une baisse des cellules CD4+CD8<sup>low</sup> et une augmentation des cellules CD3+CD8<sup>low</sup> en présence du virus CUX-1, mais non pas du virus CIA-1. Afin de vérifier si ces variations correspondent à un phénotype CD3+TCR $\gamma\delta$ +, des thymocytes de poussins de 7 jours SPF sont infectés *in vitro* par le CUX-1 et le CIA-1 et incubés pour une période de 72hrs, en utilisant le surnageant des cellules MDCC comme contrôle (ou cellules non-infectées). Les thymocytes sont alors lavés et immunomarqués avec des TCR $\gamma\delta$ -FITC/CD3-PE et analysés en cytofluorométrie.

Tel que déjà observé, l'analyse FSC/SSC révèle les mêmes deux sous-populations en fonction des paramètres FSC/SSC (Fig. 19A). Encore une fois peu de différences dans les pourcentages des cellules de chacune de ces régions entre les cellules non-infectées et infectées par le CUX-1 et le CIA-1 (Figs 19A i, ii et iii).

L'analyse multiparamétrique des cellules de ces deux régions montre plusieurs sous-populations en fonction de l'intensité de l'expression des marqueurs CD3 et TCR $\gamma\delta$ . Ainsi, les cellules exprimant les phénotypes CD3+TCR $\gamma\delta$ <sup>low</sup> et CD3+TCR $\gamma\delta$ <sup>high</sup> sont les principales sous-populations observées chez les cellules non-infectées et infectées de la région R2 (FSC/SSC élevés) (Figs 19 Bi, ii et iii). Les cellules de la région R2 n'exprimant pas le marqueur CD3 ou présentant le phénotype CD3+TCR $\gamma\delta$ - sont peu représentées dans cet échantillon. L'ajout de virus n'entraîne aucune variation significative chez ces sous-populations (Fig. 20b). Par contre, dans la région R1, tel que montré dans les figures 17Biv, v et vi, toutes les sous-populations sont présentes en pourcentages variant entre 11% et 39% sauf pour les sous-population CD3-TCR $\gamma\delta$ <sup>high</sup> et CD3+TCR $\gamma\delta$ - qui sont présentes à moins de 6%. La présence virale n'entraîne aucune variation significative de ces sous-populations (Fig. 20a).

### A) FSC/SSC



### B) Marquages CD3/TCR $\gamma\delta$

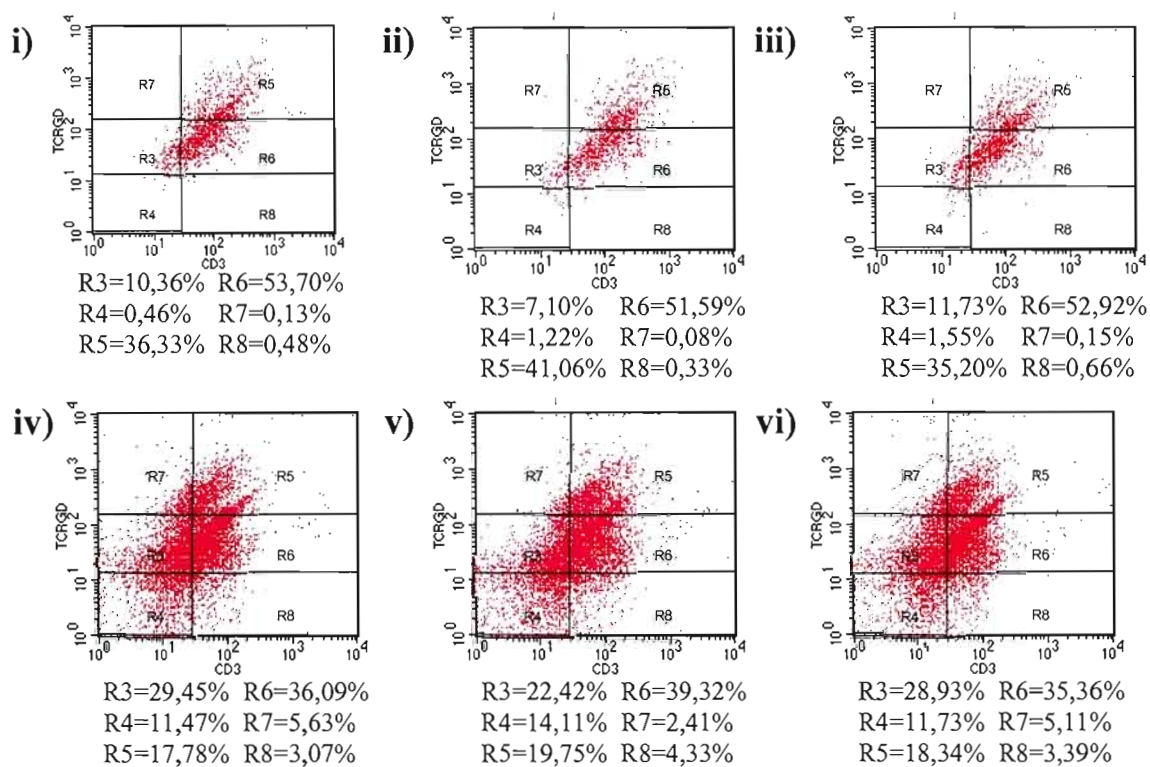


Figure 19 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), et analyse phénotypique des différentes sous populations CD3/TCR $\gamma\delta$  (B) pour les thymocytes normaux R2 (i, ii et iii) et apoptotiques R1 (iv, v et vi) non-infectées (i et iv) et infectés par les virus CUX-1 (ii et v) ou CIA-1 (iii et vi).

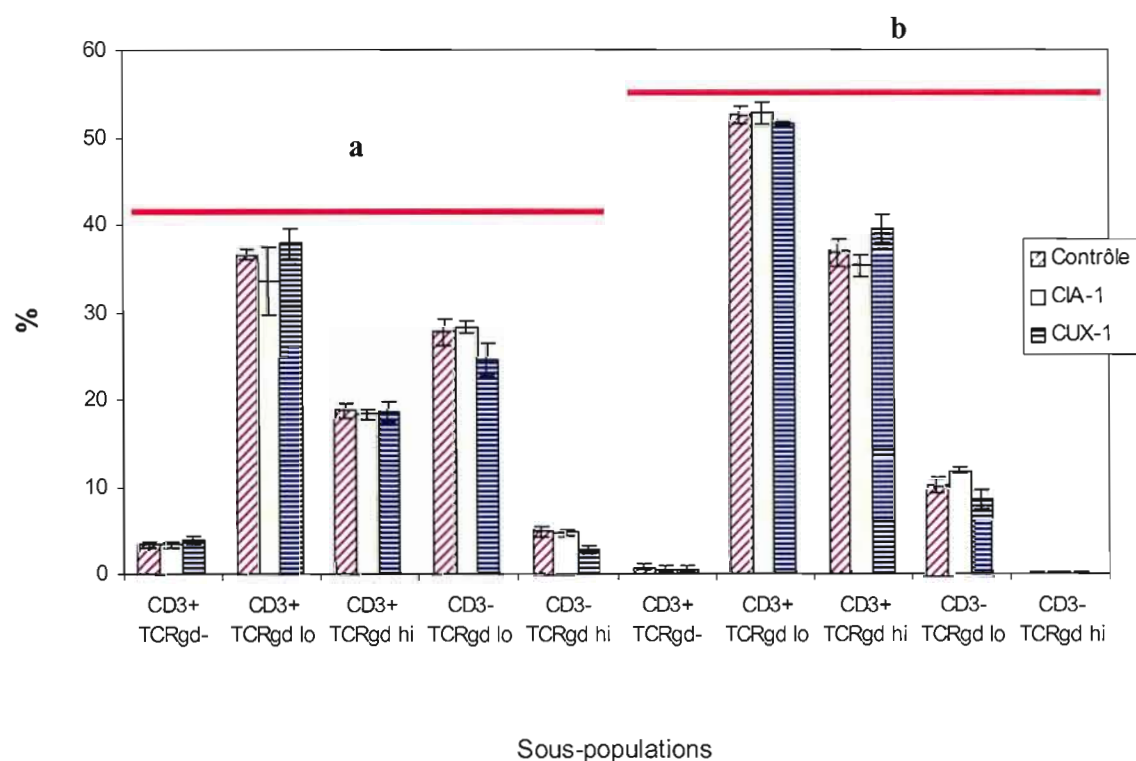


Figure 20 : Pourcentages des différentes sous-populations CD3/TCR $\gamma\delta$  chez les thymocytes apoptotiques (a) et normaux (b), non-infectés et infectés par les virus CUX-1 ou CIA-1. Expérience réalisée en triplicata.

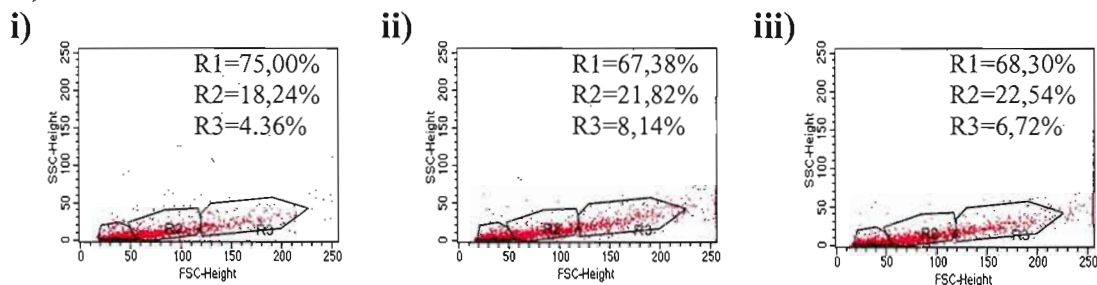
### 3.1.3. Poussins commerciaux 1jr

#### 3.1.3.1. Apoptose causée par le CAV

Les poussins commerciaux proviennent de reproducteurs recevant une vaccination. Il est observé que les organes lymphoïdes de ces poussins sont plus développés, suggérant une meilleure capacité à répondre à des stimulations antigéniques. Afin de vérifier si le virus CAV montre un meilleur tropisme pour les cellules thymiques de ces poussins par rapport à celles de poussins SPF d'un jour, des thymocytes de poussins commerciaux de 1 jour sont mis en culture et infectés avec les virus CUX-1 et CIA-1 à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1 pour des périodes de 72hrs. Ensuite, les cellules sont marquées avec de l'Annexin V-FITC et de l'Iodure de propidium pour être analysées en cytofluorométrie. La figure 21A montre que les cellules ayant des faibles FSC et SSC sont retrouvées dans la région R1 et les cellules ayant des FSC et SSC normaux sont représentées par la région R2. Il y a très peu de différence pour les pourcentages de ces deux régions (R1 et R2) entre les cellules non-infectées et celles infectées par le CIA-1 ou CUX-1.

Dans la région R2, 80% des cellules sont en apoptose avancée (AnnexinV+IP+) et 20% sont en début d'apoptose (AnnexinV+IP-) (Figs 21 Bi, ii et iii). L'ajout de virus ne cause aucune variation dans les pourcentages d'apoptose (Fig. 22b). Par contre, les cellules de la région R1 contiennent autant de cellules en apoptose avancée (IP+AnnexinV+) que des cellules en début d'apoptose (IP-AnnexinV+) (Figs 21 Biv, v et vi). La présence du phénotype IP+AnnexinV- dans la région R1 correspond à des cellules fragmentées ou à des corps apoptotiques dont l'ADN est marqué par l'IP. Dans cette région R1, les virus CIA-1 ou CUX-1 entraînent une augmentation significative des cellules en début d'apoptose (IP-AnnexinV+) ( $p < 0.05$ ) et des cellules en apoptose avancée (IP+AnnexinV+) ( $p < 0.05$ ) (Fig. 22a).

# A) FSC/SSC



# B) AnnexinV / Iodure de Propidium

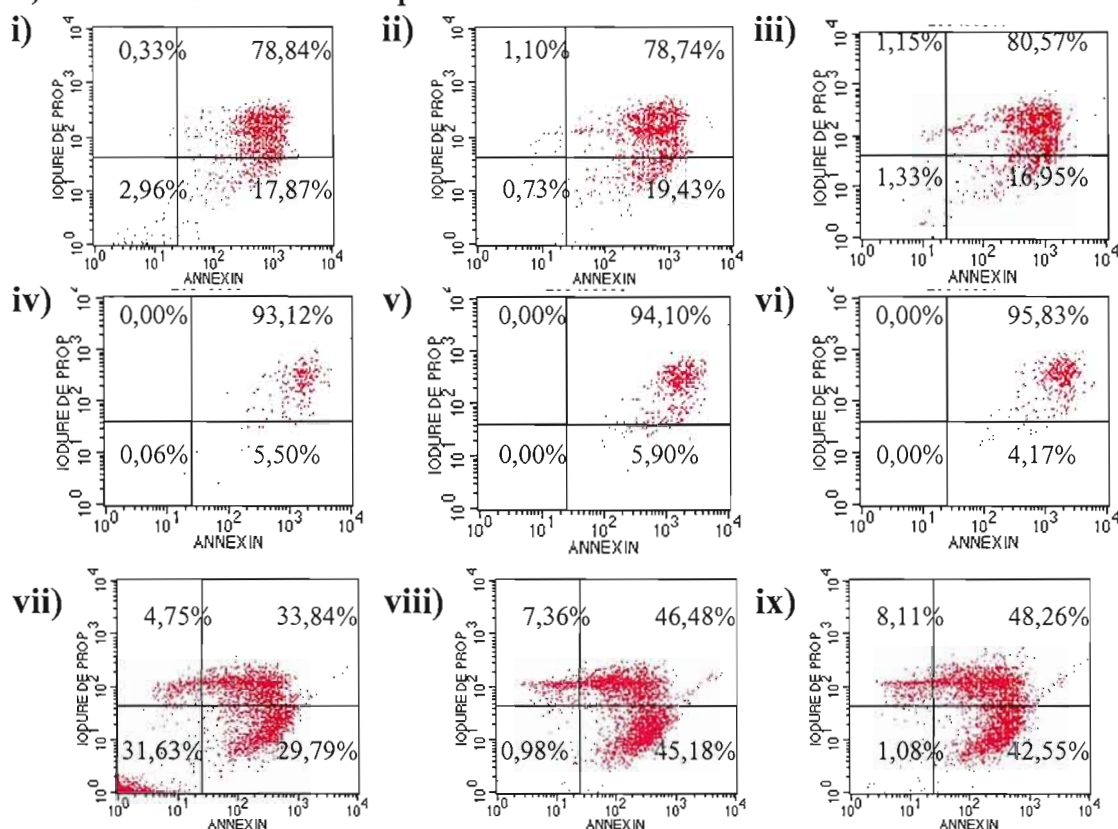


Figure 21 : Analyse FSC/SSC (A) des régions de cellules de thymocytes de poussins commerciaux 1jr après 72hrs d'infection *in vitro* avec le surnageant cellulaire (i), les virus CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii) et analyse des pourcentages des populations ANNEXIN V/ Iodure de Propidium (B) pour les cellules normales (R2) (i, ii et iii), (R3) (iv, v et vi) et apoptotiques (R1) (vii, viii et ix) chez des cellules non-infectées (i, iv et vii) et infectées par les virus CUX-1 (ii, v et viii) ou CIA-1 (iii, vi et ix).

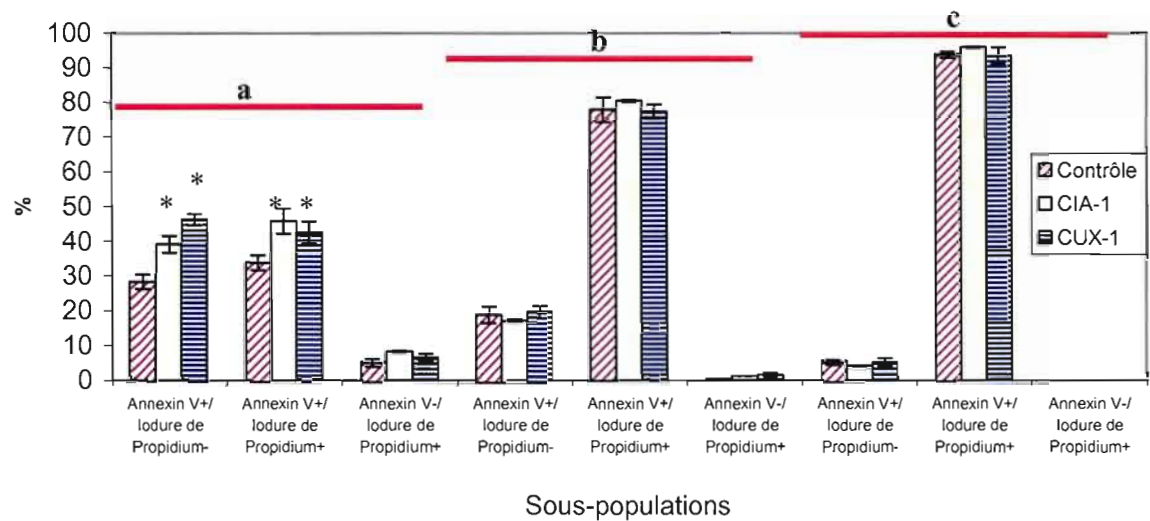


Figure 22: Pourcentages des sous-populations ANNEXIN V/Iodure de Propidium pour les thymocytes non-infectés et infectés par les virus CUX-1 ou CIA-1, apoptotiques (R1) (a) et normaux (R2) (b) et (R3) (c).

\* p < 0.05



### 3.1.3.2. Analyse phénotypique des sous-populations thymiques

#### 3.1.3.2.1. Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD4/CD8 infectées par le CUX-1 et le CIA-1

Afin de vérifier laquelle ou lesquelles des populations thymiques sont apoptotiques suite aux infections virales, des thymocytes de poussins commerciaux de 1 jour sont infectés *in vitro* par les virus CUX-1 et le CIA-1 et incubés pour une période de 72hrs, en utilisant le surnageant des cellules MDCC comme contrôle (ou cellules non-infectées). Les thymocytes sont alors lavés, immunomarqués avec des CD4-FITC / CD8-PE et analysés en cytofluorométrie.

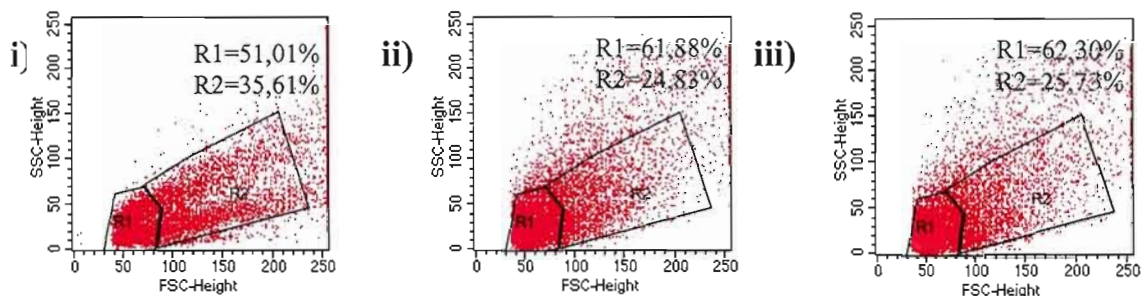
Tel que déjà observé, l'analyse FSC/SSC a révélé les mêmes deux sous-populations en fonction des paramètres FSC/SSC (Fig. 23A). Les pourcentages des cellules de la région R1 infectées par la souche CUX-1 ou CIA-1 augmentent d'environ 10% par comparaison avec les cellules contrôles non-infectées (Figs 23Ai, ii et iii).

L'analyse multiparamétrique des cellules de ces deux régions montre plusieurs sous-populations en fonction de l'intensité de l'expression des marqueurs CD4 et CD8. Ainsi, des cellules exprimant les phénotypes CD4+CD8<sup>high</sup> sont les principales sous-populations observées chez les cellules non-infectées et infectées de la région R2 (FSC/SSC élevés) (Figs 23Bi, ii et iii). Par contre, l'ajout de la souche virale CUX-1 seulement, induit une baisse significative ( $p < 0.05$ ) de la sous-population CD4+CD8<sup>low</sup> entraînant aussi une hausse significative ( $p < 0.05$ ) de la sous-population CD4+CD8<sup>high</sup> (Fig. 24b). D'autre part, toutes les sous-populations sont représentées sauf la sous-population CD4+CD8- dans la région R1, tel que montré par les figures 23 Biv, v et vi. La souche CUX-1 entraîne une baisse significative ( $p < 0.05$ ) de la sous-population CD4-CD8<sup>low</sup> (Fig. 24a). Par contre, la présence du virus CIA-1 a engendré une baisse significative de la sous-population



CD4+CD8<sup>low</sup> ( $p < 0.05$ ) et une hausse significative de la sous-population CD4+CD8<sup>high</sup> ( $p < 0.05$ ) (Fig. 24a). Les deux souches affectent les mêmes sous-populations, mais les effets sont généralement plus évidents avec la souche CUX-1 qu'avec la CIA-1. Ces variations sont également observées dans les cellules de la région R2 ( $p < 0.05$ ) pour les cellules CD4+CD8<sup>low</sup> et CD4+CD8<sup>high</sup>.

### A) FSC/SSC



### B) Marquages CD4/CD8

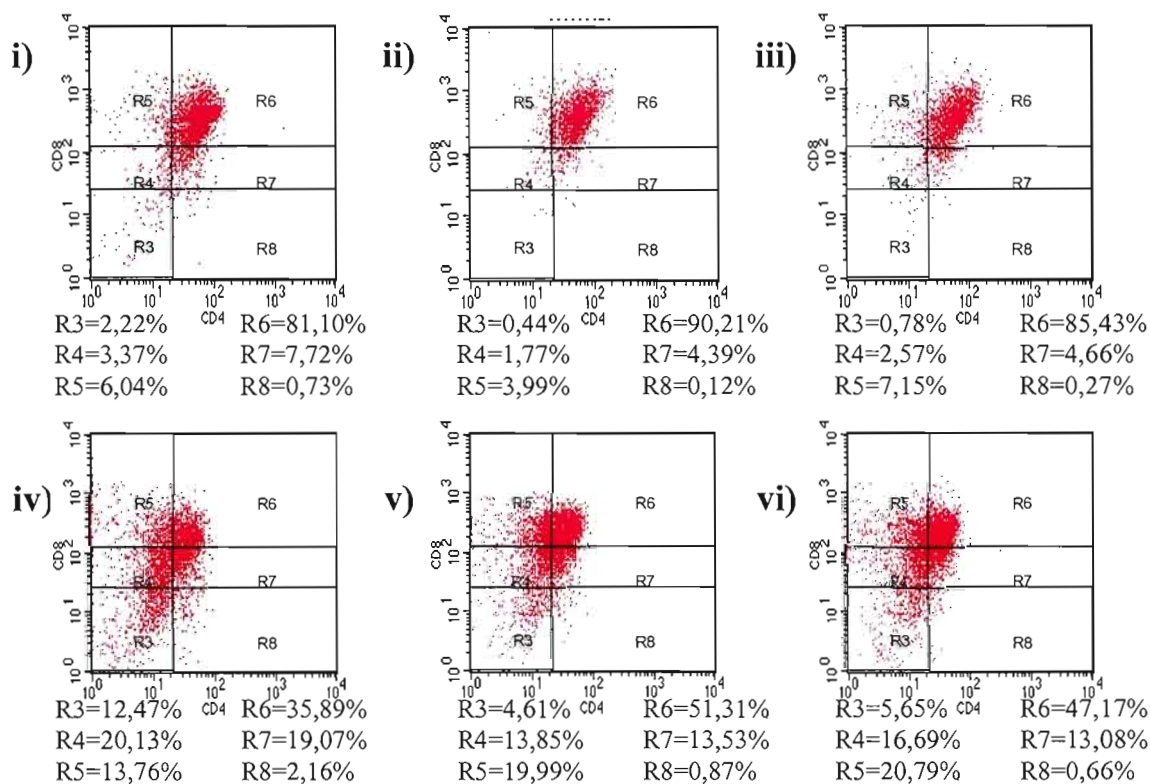


Figure 23 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), et analyse phénotypique des différentes sous populations CD4/CD8 (B) pour les thymocytes normaux R2 (i, ii et iii) et apoptotiques R1 (iv, v et vi), non-infectées (i et iv) et infectés par les virus CUX-1 (ii et v) ou CIA-1 (iii et vi).

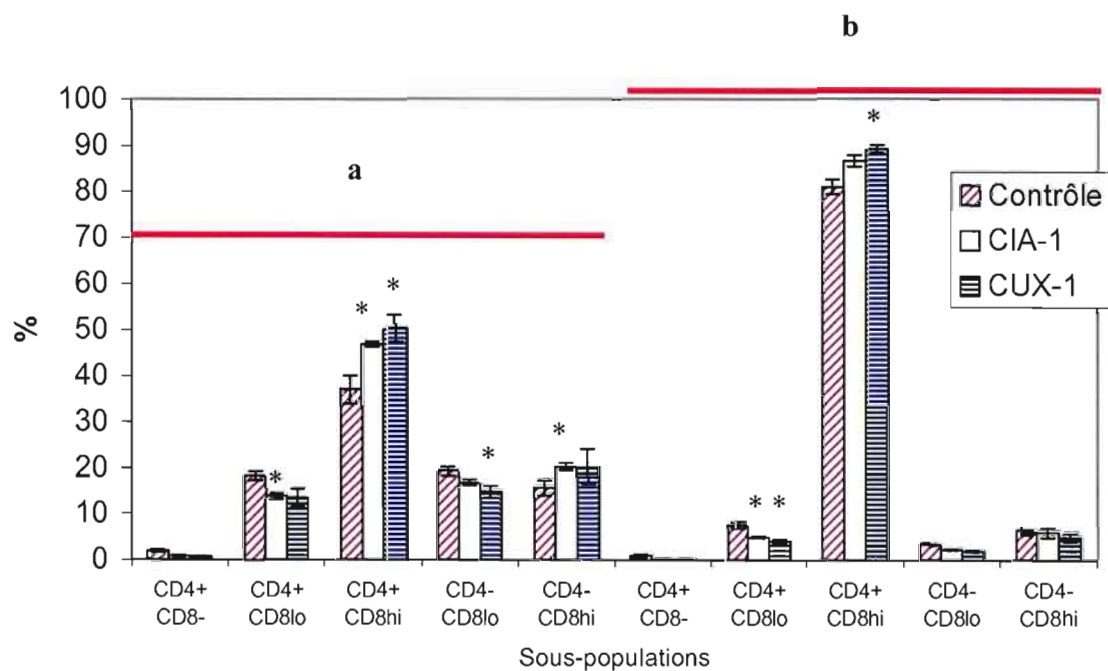


Figure 24 : Pourcentages des différentes sous-populations CD4/CD8 pour les thymocytes témoins et infectés par les virus CUX-1 et CIA-1 apoptotiques (R1) (a) et normaux (R2) (b). Expérience réalisée en triplicata.

\*  $p < 0.05$

### 3.1.4. Comparaison des sous-populations CD4/CD8 chez des thymocytes de poussins de 1jr SPF et commerciaux.

Les sous-populations CD4/CD8 présentes chez les poussins commerciaux peuvent être non seulement en proportions différentes de celles présentes chez les poussins SPF du même âge, mais peuvent aussi montrer une sensibilité différente aux virus CAV. Afin de vérifier cette hypothèse, les pourcentages de chacune des sous-populations thymiques ont été analysées en combinant les données obtenues dans les expériences montrées dans les figures 1, 2, 3, 4, 23 et 24. Ainsi deux histogrammes sont obtenus où le premier compare les données pour le virus de référence CUX-1 (Figure 25A) et le deuxième concerne le virus CIA-1 (Figure 25B). Tel que montré dans la figure 25, les sous-populations thymiques ne sont pas présentes dans les mêmes proportions selon qu'elles proviennent de cellules thymiques de poussins SPF ou commerciaux et ce, pour les cellules localisées dans les régions dites apoptotiques (R1) (a) et non-apoptotiques (R2) (b).

Les populations  $CD4+CD8^{high}$  sont en plus fortes proportions, autant dans la région R1 et R2, chez les thymocytes en provenance de poussins commerciaux (Fig. 25A). Aussi, les pourcentages des populations  $CD4+CD8^{low}$ ,  $CD4-CD8^{low}$  et  $CD4-CD8^{high}$  apoptotiques sont en proportions plus élevés chez les thymocytes en provenance de poussins commerciaux. Suite à l'infection par les virus CUX-1 et CIA-1, la population  $CD4+CD8^{high}$  est augmentée seulement chez les thymocytes de poussins commerciaux (Figs 25A et B).

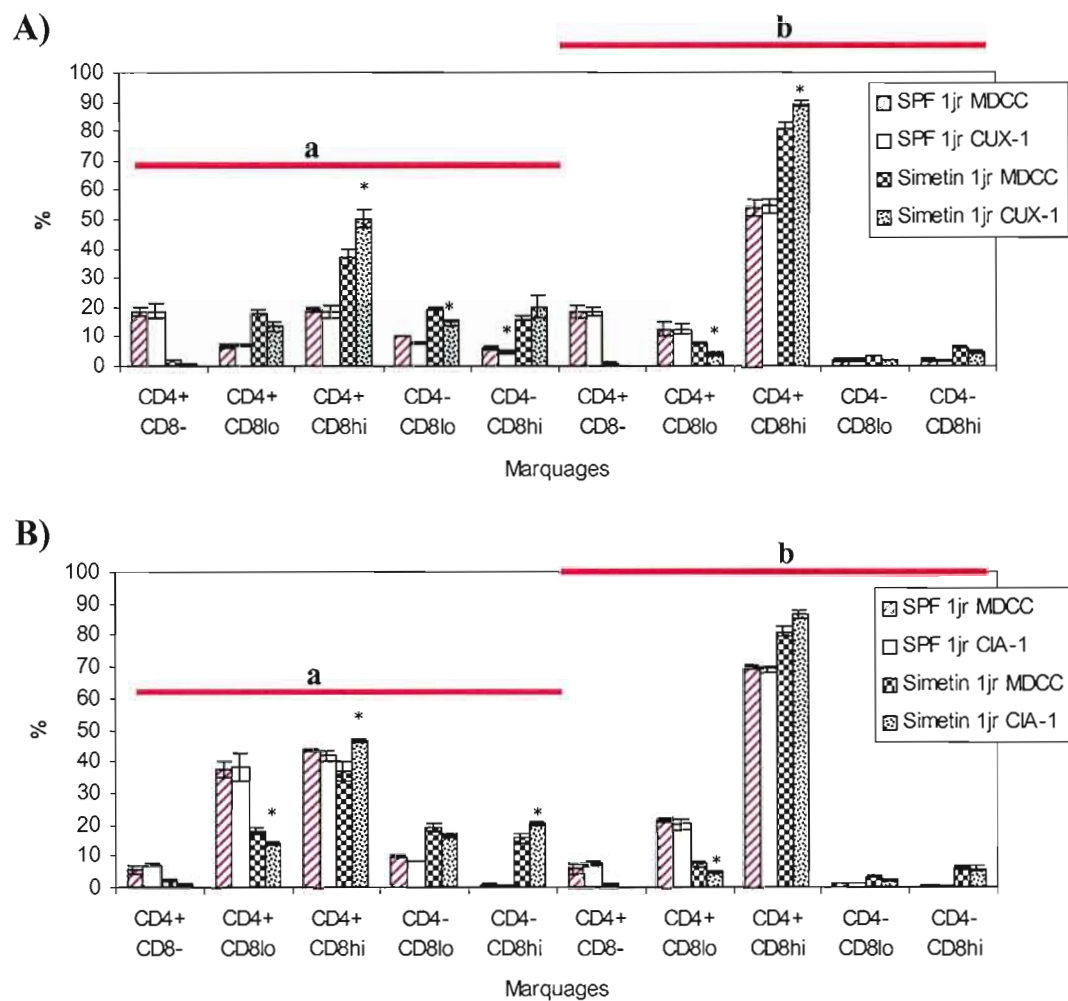


Figure 25: Pourcentages des sous-populations CD4/CD8 de thymocytes de poussins d'un jour SPF et commerciaux ayant été infectés par les souches virales CUX-1 (A) ou CIA-1 (B) pour la région apoptotique (R1) (a) et non-apoptotique (R2) (b).

### **3.1.5. Détection de l'ADN viral dans les thymocytes aviaires infectés codant pour la protéine VP3 du CAV.**

Afin de relier les effets apoptotiques et les modifications phénotypiques observées dans les thymocytes de poussins SPF et commerciaux à la réplication virale, la présence d'ADN viral codant pour la protéine VP3 est recherchée par un test PCR. La présence d'ADN viral, plus précisément de la région codant pour la VP3 (l'apoptine), permet d'observer s'il y a réplication virale dans les thymocytes après leur infection. Les thymocytes sont incubés durant 24heures avec le traitement déterminé (surnageant de cellules, virus CUX-1 et CIA-1) pour être ensuite lavés, resuspendus dans un nouveau milieu de culture et incubés à nouveau pour une période de 48heures. Ensuite, les surnageants sont récoltés et congelés à -80C. Afin d'évaluer la présence virale, l'ADN de ces surnageants est extraite et amplifiée avec les amorces (VP3F et VP3R) de la VP3 pour 35 cycles (cycle optimal pour l'amplification). Ensuite, le produit de PCR est soumis à une migration dans un gel d'agarose à 1,5%.

Tel que montré dans les figures 26A, B et C, la présence d'ADN codant pour la VP3 est observée dans les trois groupes de poussins (Figs 26A puits 6, 7 et 8; 26B puits 3 et 4; 26C puits 5 et 6). L'ADN viral n'est pas détecté dans les autres échantillons contrôles correspondant aux cellules non-infectés (Témoin négatif) et témoins de contrôle négatifs (blancs) (Figure 26A puits 2,3 et 4; 26B puits 1, 2, 5 et 6; 26C puits 1, 2, 3 et 4).

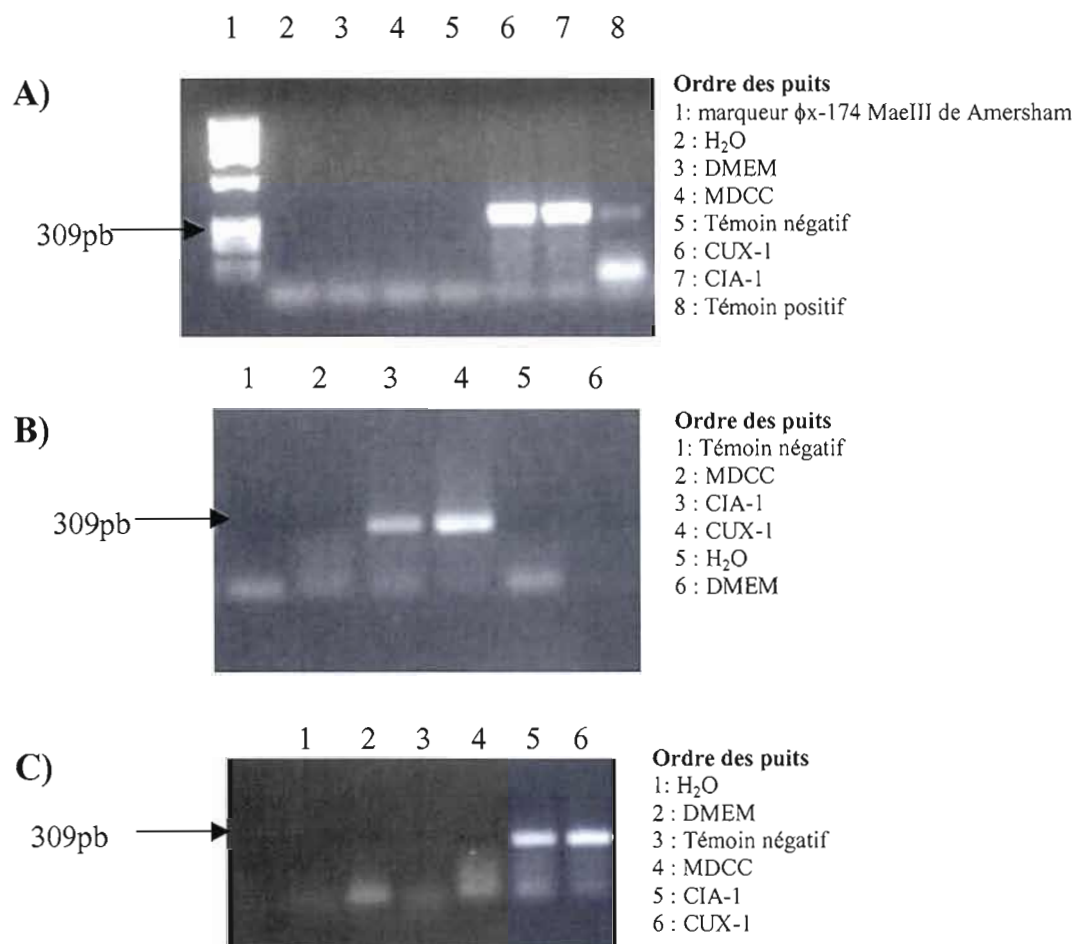


Figure 26 : Détection de l'ADN viral (protéine VP3) dans les surnageants provenant des thymocytes de poussins SPF 1jr (A), 7jrs (B) et commerciaux 1jr (C), incubés 24 heures avec le surnageant contrôle (MDCC), la souche CUX-1 et la souche CIA-1, lavés à deux reprises avec du RPMI (SVF 20%) et réincubés pour une période de 48 heures. Résultats représentatifs de trois expériences similaires.



### **3.2. Effets *in vitro* du virus CAV sur les cellules de rate de poussins SPF.**

Dans le but de vérifier si les virus CAV peuvent altérer la viabilité des lymphocytes de rate *in vitro*, plusieurs expériences ont été effectuées à partir de splénocytes isolés de poussins SPF d'un et 7 jours d'âge. Ainsi, le niveau d'apoptose pouvant être induit par le CAV tout comme le phénotype des cellules altérées par l'infection ont été analysés pour les poussins de 7 jours alors que seul le phénotypage des cellules de rate a été effectué chez les poussins d'un jour, étant donné le faible nombre de lymphocytes généralement obtenu.

#### **3.2.1. Poussins SPF âgés d'un jour**

##### **3.2.1.1. Analyse phénotypique des sous-populations CD4/CD8 de splénocytes infectées par le CUX-1 et le CIA-1**

Afin de vérifier si une ou plusieurs populations spléniques sont affectées par l'infection virale, des lymphocytes de rate de poussins SPF d'un jour ont été infectés *in vitro* par les virus CUX-1 et le CIA-1 et incubés pour une période de 72hrs. Le surnageant des cellules MDCC a été utilisé comme contrôle négatif (ou cellules non-infectées). Les lymphocytes ont alors été lavés et immunomarqués avec du CD4-FITC / CD8-PE et analysés en cytofluorométrie.

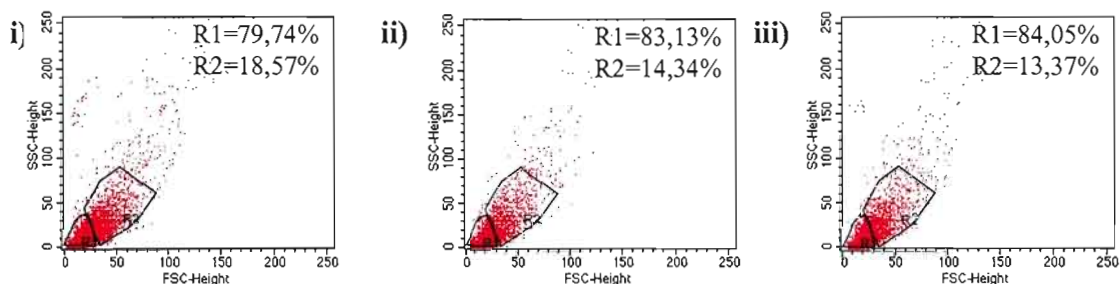
L'analyse FSC/SSC a révélé deux groupes de cellules différant par leur FSC/SSC (Fig. 27A). Les cellules de la région R2 possèdent une taille (FSC) et une granulosité (SSC) plus fortes que celles de la région R1. Il y a peu de différence dans les pourcentages de cellules dans chacune de ces régions entre les cellules non-infectées (i) et infectées par le CUX-1 (ii) ou le CIA-1 (iii), quoique le pourcentage de cellules dans la région R2 soit légèrement plus faible en présence de virus .

L'analyse multiparamétrique des cellules de ces deux régions montre que des cellules ayant un FSC/SSC élevé (région R2) expriment principalement les



phénotypes CD4+CD8+ et CD4+CD8- autant chez les cellules non-infectées qu'infectées par les virus CUX-1 et CIA-1 (Figs 27Bi, ii et iii). Les cellules ayant un FSC/SSC faible (région R1) montrent la présence de tous les phénotypes, mais principalement les phénotypes CD4-CD8-, CD4-CD8+ et CD4+CD8- (Figs 27Biv, v et vi). L'infection par le virus CUX-1 entraîne une diminution des lymphocytes des phénotypes CD4+CD8- et CD4+CD8+ en faveur des CD4-CD8+. Le virus CIA-1 montre des effets plus mitigés (Figs 27Bi, ii et iii). L'expérience a été réalisée en duplicata dû à une trop faible quantité de lymphocytes récoltés par poussin.

### A) FSC/SSC



### B) Marquages CD4/CD8

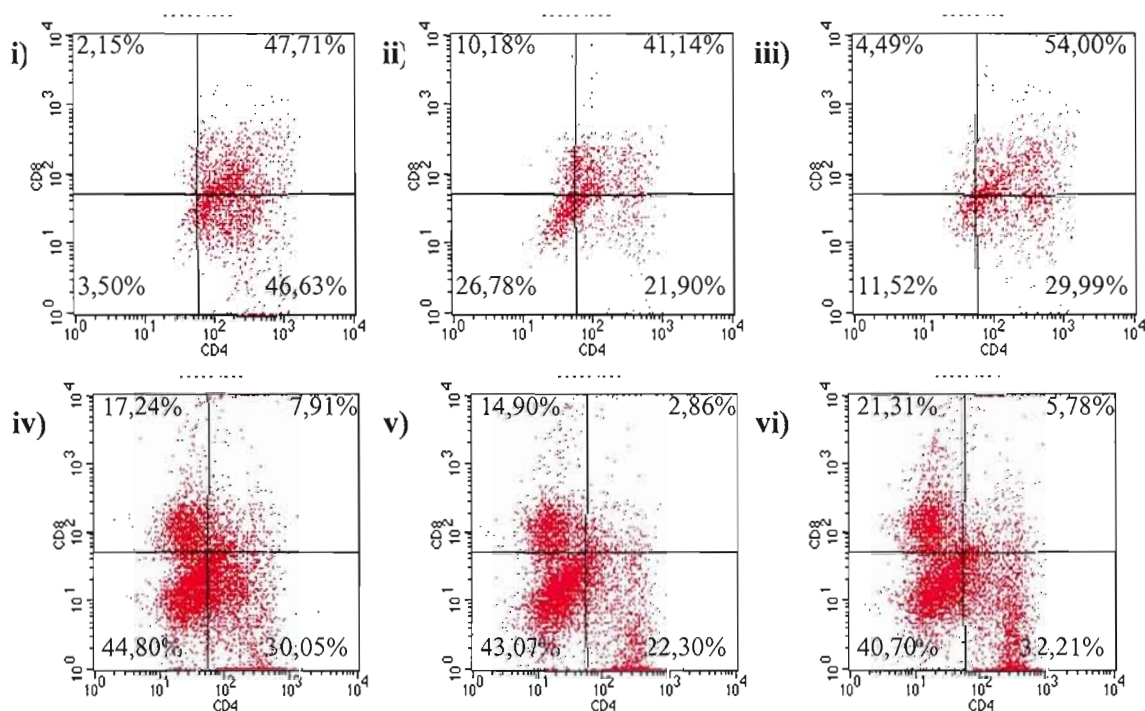


Figure 27 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), et analyse phénotypique des différentes sous populations CD4/CD8 (B) pour les lymphocytes de rate normaux R2 (i, ii et iii) et apoptotiques R1 (iv, v et vi), non-infectées (i et iv) ou infectés par les virus CUX-1 (ii et v) et CIA-1 (iii et vi).

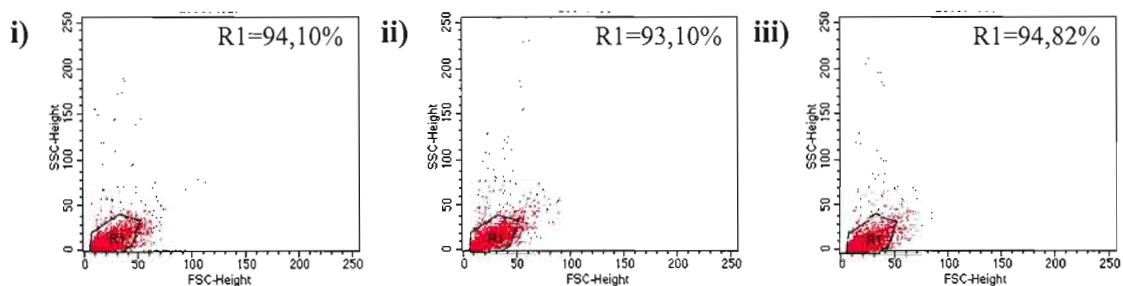
### **3.2.2. Poussins SPF âgés de 7 jours**

#### **3.2.2.1. Apoptose causée par le CAV**

Des expériences similaires à celles réalisées chez les poussins SPF d'un jour ont été réalisées avec des cellules de poussins SPF âgés de 7 jours. Les lymphocytes spléniques ont été mis en culture et infectés avec les virus CUX-1 et CIA-1 à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1 pour une période de 72hrs.

Afin de vérifier le niveau d'apoptose chez les cellules spléniques, les cellules ont été marquées par le réactif TUNEL et analysées en cytofluorométrie. Tel que montré dans la figure 28A, les cellules se retrouvent dans une région de faible FSC et SSC. L'état apoptotique de ces cellules a été confirmé par le test TUNEL où près de 80% de ces cellules non-infectées et infectées se sont avérées positives (Figs 28B i à iii). Peu de différences dans les pourcentages des splénocytes n'ont été observées entre les cellules non-infectées et les cellules infectées par les deux virus. L'analyse statistique révèle que les pourcentages de cellules TUNEL+ ne varient pas en présence du virus CIA-1 ou CUX-1 (Fig. 29).

### A) FSC/SSC



### B) TUNEL

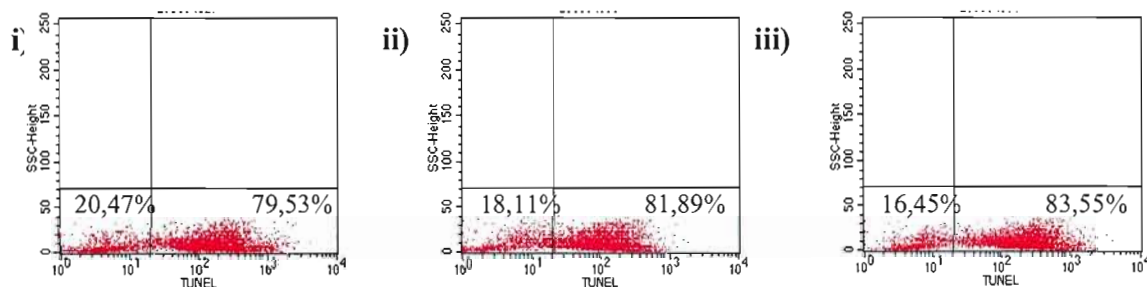


Figure 28: Analyse FSC/SSC (A) et pourcentages des cellules TUNEL positives dans la région sélectionnée (B) des lymphocytes de rate de poussins SPF de 7 jrs après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii) comparées aux cellules non-infectées (i).

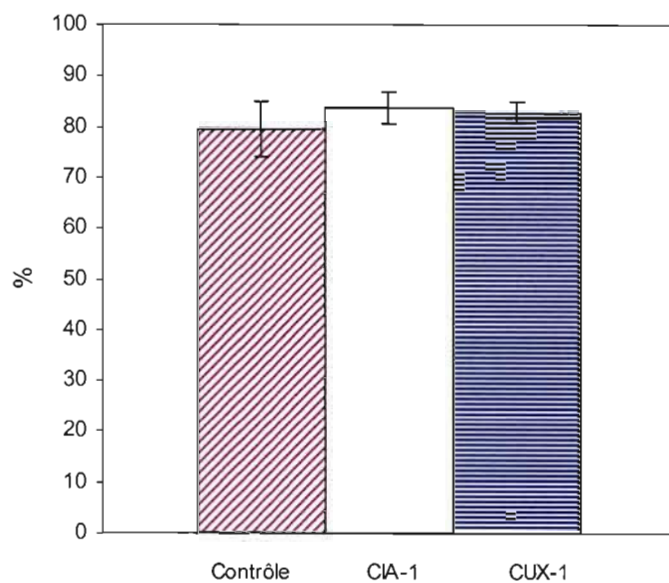
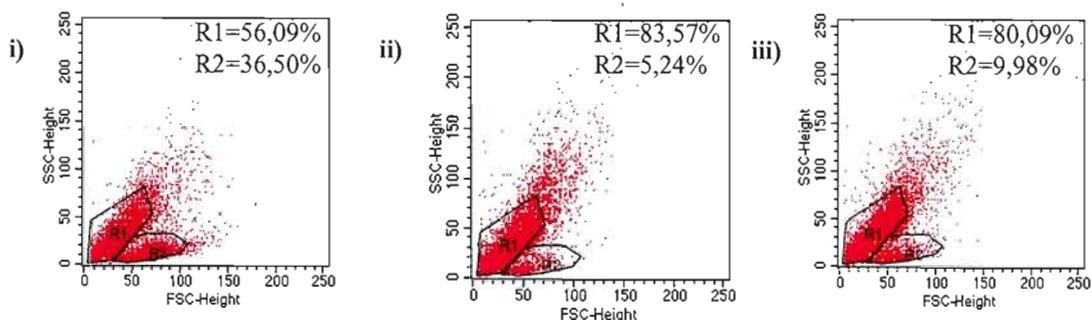


Figure 29: Pourcentages des lymphocytes de rate de poussins SPF de 7jrs TUNEL+ après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 et CIA-1 comparés aux cellules non-infectés. Expérience réalisée en triplicata.

Afin de vérifier si les virus induisent une apoptose précoce ou tardive, les cellules ont plutôt été marquées par de l'Annexin V-FITC et de l'IP-PE suivi d'une analyse en cytofluorométrie. Ce marquage a permis de distinguer deux groupes de cellules ayant des FSC/SSC différents (Fig. 30A). Les cellules ayant un faible FSC/SSC sont représentées dans la région R1, les cellules ayant un FSC élevé avec un faible SSC sont localisées dans la région R2. Il y a une augmentation d'environ 25% des cellules de la région R1 en présence des virus CUX-1 et CIA-1. Dans la région R1 il y a principalement des cellules en apoptose avancé (IP+AnnexinV+) avec une très forte intensité (Figs 30 Bvii, viii et ix). L'observation du phénotype IP+AnnexinV- dans la région R1 correspond à des cellules fragmentées ou à des corps apoptotiques où l'ADN est marquée par l'IP. La présence du virus CUX-1 entraîne une tendance à l'apoptose précoce (IP-AnnexinV+) et tardive (IP+AnnexinV+) (Fig. 31a) chez les cellules de la région R1. Par contre, il y très peu de différence détectable pour les pourcentages de la région R2 entre les cellules non-infectées et celles infectées par les virus CIA-1 ou CUX-1. Toutefois, les cellules de la région R2 sont majoritairement non-apoptotiques de par leur phénotype IP-AnnexinV-, mais en présence de virus il y a augmentation du pourcentage des cellules en apoptose avancée (IP+AnnexinV+) (Figs 30 Bi, ii et iii). Le virus CUX-1 favorise l'apoptose tardive dans les cellules de la région R2 (Fig. 31b). Cependant, il faut mentionner que l'expérience a été réalisée en duplicata, à cause du faible nombre de cellules ce qui ne permet pas d'avoir une analyse statistique valable.

### A) FSC/SSC



### B) Annexin V/Iodure de Propidium

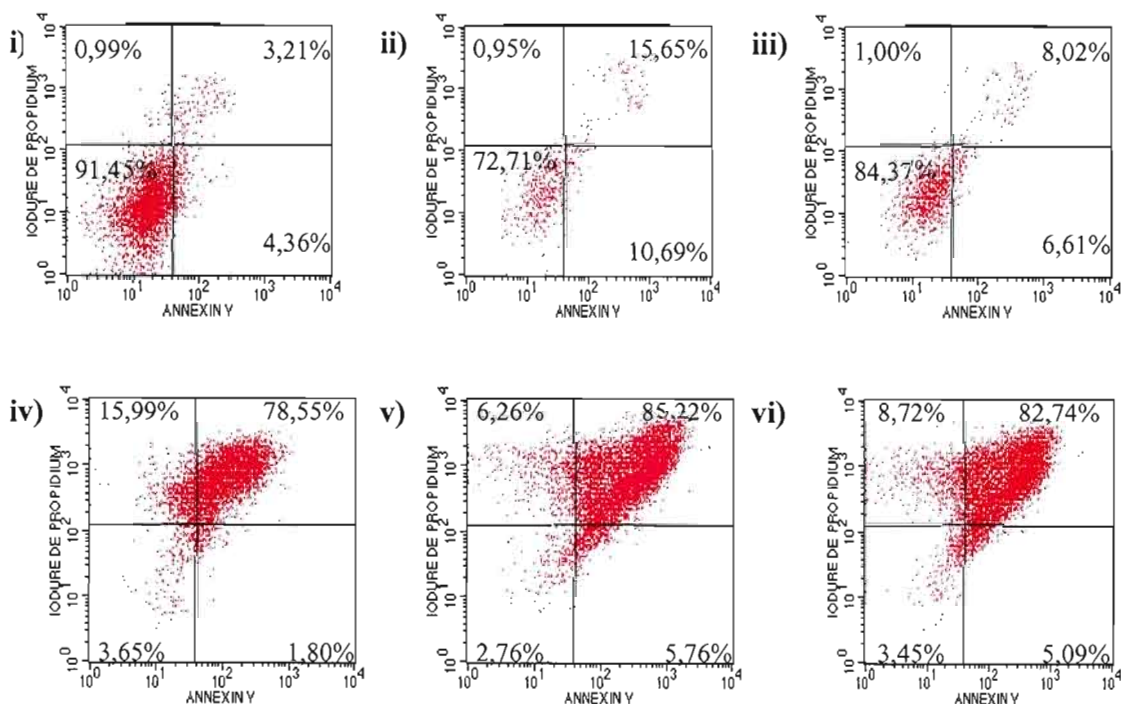


Figure 30 : Analyse FSC/SSC (A) des lymphocytes de rate de poussins SPF 7jrs après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii) comparés à des cellules non-infectées (i) et analyse multiparamétrique des populations Annexin V/Iodure de Propidium (B) pour les cellules des régions R2 (i, ii et iii) et R1 (iv, v et vi) chez des cellules non-infectées (i et iv), ou infectées avec les virus CUX-1 (ii et v) et CIA-1 (iii et vi).

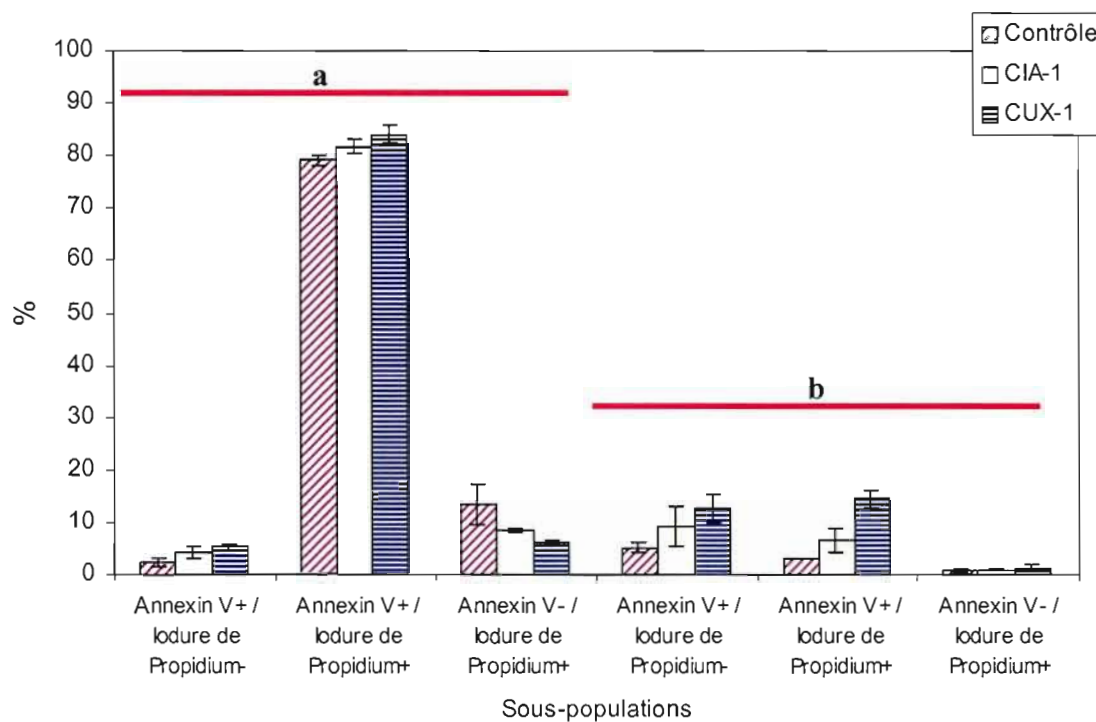


Figure 31: Pourcentages des différentes sous-populations Annexin V/Iodure de Propidium pour les lymphocytes de rate témoins et infectés par les virus CUX-1 et CIA-1 dans les régions R1 (FSC/SSC faibles) (a) et R2 (FSC/SSC normaux) (b). Expérience réalisée en duplicata.



### **3.2.2.2. Analyse phénotypique des sous-populations spléniques**

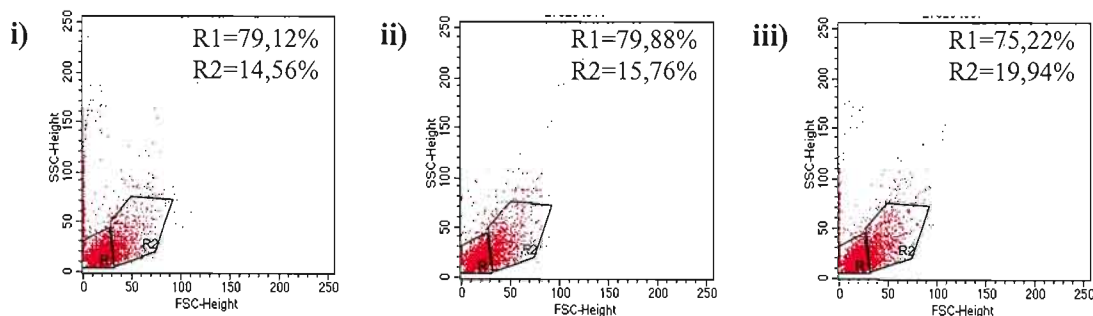
#### **3.2.2.2.1. Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD4/CD8 infectées par le CUX-1 et le CIA-1**

Afin de vérifier si une ou plusieurs populations spléniques sont affectées par l'infection virale, des lymphocytes de rate de poussins SPF de 7 jours ont été infectés *in vitro* par les virus CUX-1 et le CIA-1 et incubés pour une période de 72hrs, en utilisant le surnageant des cellules MDCC comme contrôle (ou cellules non-infectées). Les lymphocytes ont alors été lavés et immunomarkés avec du CD4-FITC / CD8-PE et analysés en cytofluorométrie.

Tel que montré dans la figure 32A (i, ii et iii), l'analyse FSC/SSC de ces cellules révèle deux groupes de cellules différant par leur FSC/SSC. Les cellules de la région R2 possèdent une taille (FSC) et une granulosité (SSC) plus fortes que celles de la région R1. Peu de différences dans les pourcentages de cellules dans chacune de ces régions sont mises en évidence entre les cellules non-infectées et infectées par les virus CUX-1 et le CIA-1.

L'analyse multiparamétrique des cellules de ces deux régions révèle que des cellules ayant un FSC/SSC élevé (région R2) appartiennent principalement aux phénotypes CD4+CD8- suivi d'un faible pourcentage de cellules phénotypées CD4-CD8+ (Figs 32Bi, ii et iii). Les cellules ayant un FSC/SSC faible (région R1) montrent la présence de tous les phénotypes, mais principalement les phénotypes, CD4-CD8+ et CD4+CD8- (Figs 32Biv, v et vi). La présence des deux virus entraîne une baisse significative des cellules de la région R1 ayant le phénotype CD4-CD8+ ( $p < 0.05$ ) (Fig. 33a). Par contre, il n'y a aucune différence significative chez les sous-populations de la région R2 (Fig. 33b) causée par la présence virale.

### A) FSC/SSC



### B) Marquages CD4/CD8

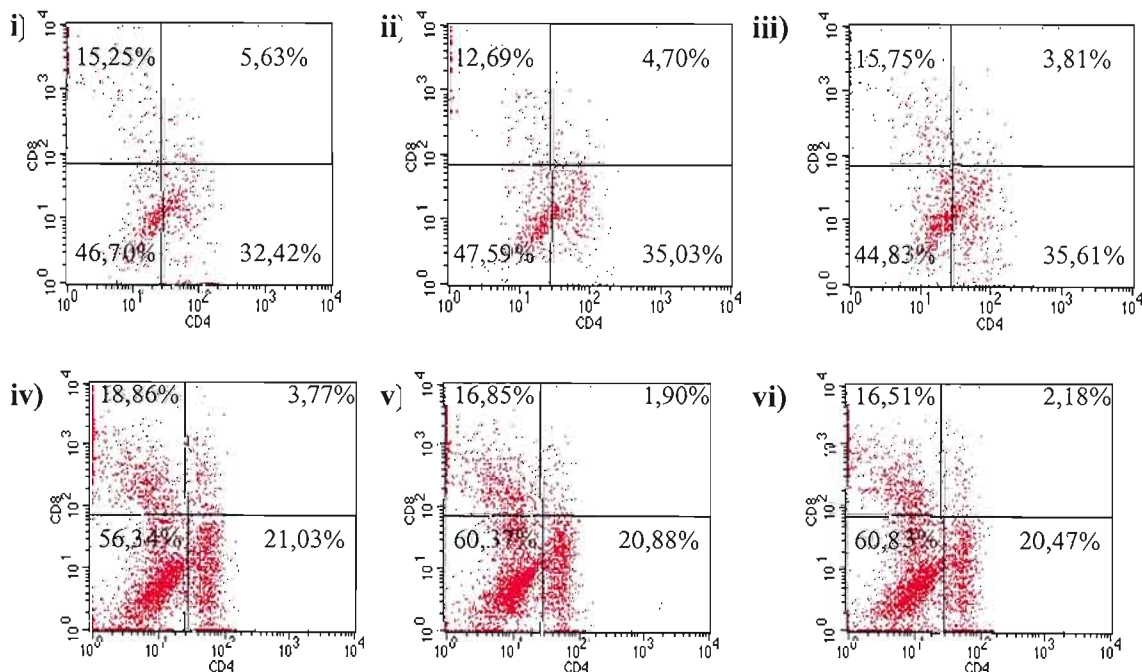


Figure 32 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), et analyse phénotypique des différentes sous populations CD4/CD8 (B) pour les lymphocytes de rate normaux R2 (i, ii et iii) et apoptotiques R1 (iv, v et vi), non-infectées (i et iv) ou infectés par le CUX-1 (ii et v) et par le CIA-1 (iii et vi).

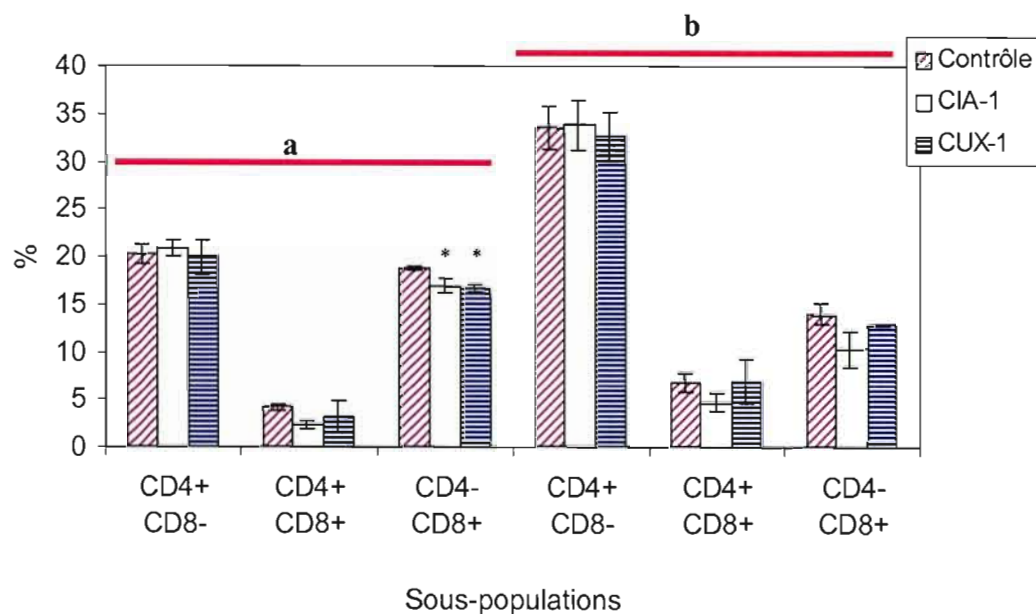


Figure 33 : Pourcentages des différentes sous-populations CD4/CD8 pour les lymphocytes de rate témoins et infectés par les virus CUX-1 et CIA-1 dans les régions R1 (FSC/SSC faibles) (a) et R2 (FSC/SSC normaux) (b). Expérience réalisée en triplicata.

\*  $p < 0.05$

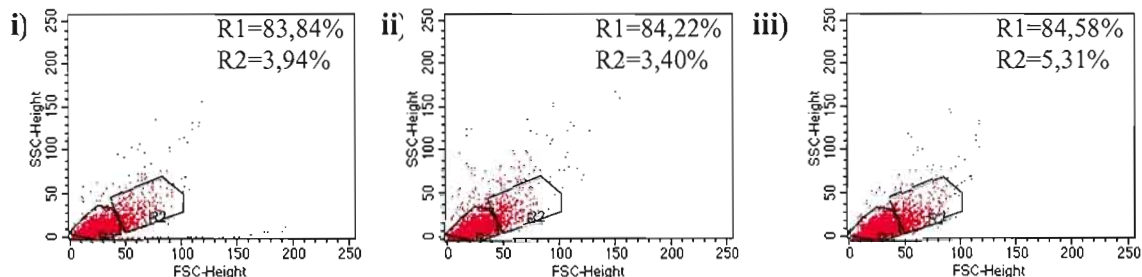
### 3.2.2.2. Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires CD3/CD8 infectées par les virus CUX-1 et le CIA-1

Il a été possible d'observer dans la section précédente une baisse des cellules spléniques CD8+. Ces cellules comprennent deux sous-populations, les CD3+CD8+ correspondant aux lymphocytes cytotoxiques, et les CD3-CD8+ associés aux cellules NK. Afin de caractériser plus précisément le type de sous-population cellulaire CD8 splénique affectée par la présence virale, des lymphocytes de rate de poussins SPF de 7 jours ont été infectés *in vitro* par le CUX-1 et le CIA-1 et incubés pour une période de 72hrs, en utilisant le surnageant des cellules MDCC comme contrôle (ou cellules non-infectées). Les lymphocytes ont alors été lavés et immunomarkés avec des anticorps anti-CD3-FITC / CD8-PE et analysés en cytofluorométrie.

Tel que déjà observé, l'analyse FSC/SSC a révélé les mêmes deux sous-populations en fonction des paramètres FSC/SSC (Fig. 34A). Encore une fois, peu de différences sont mises en évidence dans les pourcentages des cellules de chacune de ces régions entre les cellules non-infectées et infectées par les virus CUX-1 et le CIA-1 (Figs 34A i, ii et iii).

L'analyse multiparamétrique des cellules de ces deux régions montre que les phénotypes CD3+CD8<sup>low</sup> et CD3+CD8<sup>high</sup> sont les principales sous-populations observées dans la région R2 (FSC/SSC élevés) chez les cellules non-infectées et infectées (Figs 34 Bi, ii et iii). L'ajout des deux virus n'a entraîné aucune variation significative chez les sous-populations de la région R1 (Fig. 35a). Toutefois, la présence des deux souches virales a causé une augmentation significative chez les cellules de la région R2 phénotypées CD3+CD8<sup>low</sup> ( $p < 0.05$ ) (Fig. 35b). Aussi la présence de la souche CUX-1 a fait diminuer de manière significative la sous-population CD3+CD8<sup>high</sup> ( $p < 0.05$ ).

### A) FSC/SSC



### B) Marquages CD3/CD8

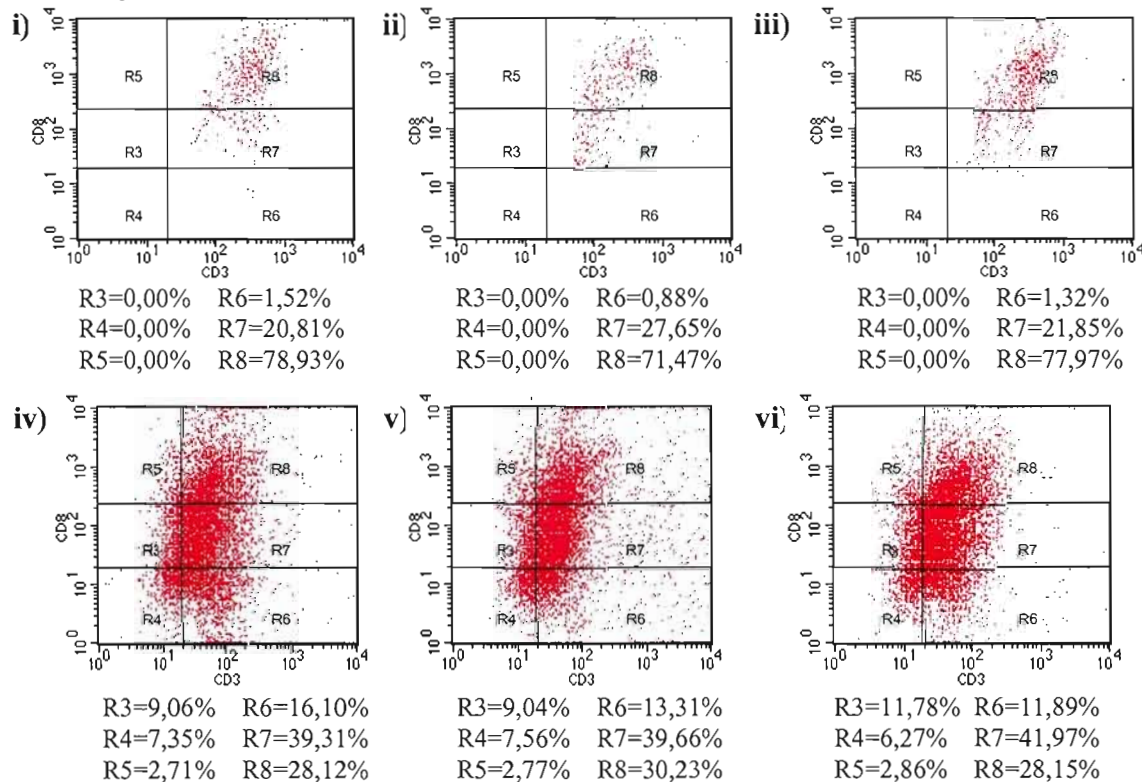


Figure 34 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), et analyse phénotypique des différentes sous populations CD3/CD8 (B) pour les lymphocytes de rate normaux R2 (i, ii et iii) et apoptotiques R1 (iv, v et vi), non-infectées (i et iv) et infectés par le virus CUX-1 (ii et v) ou le CIA-1 (iii et vi).

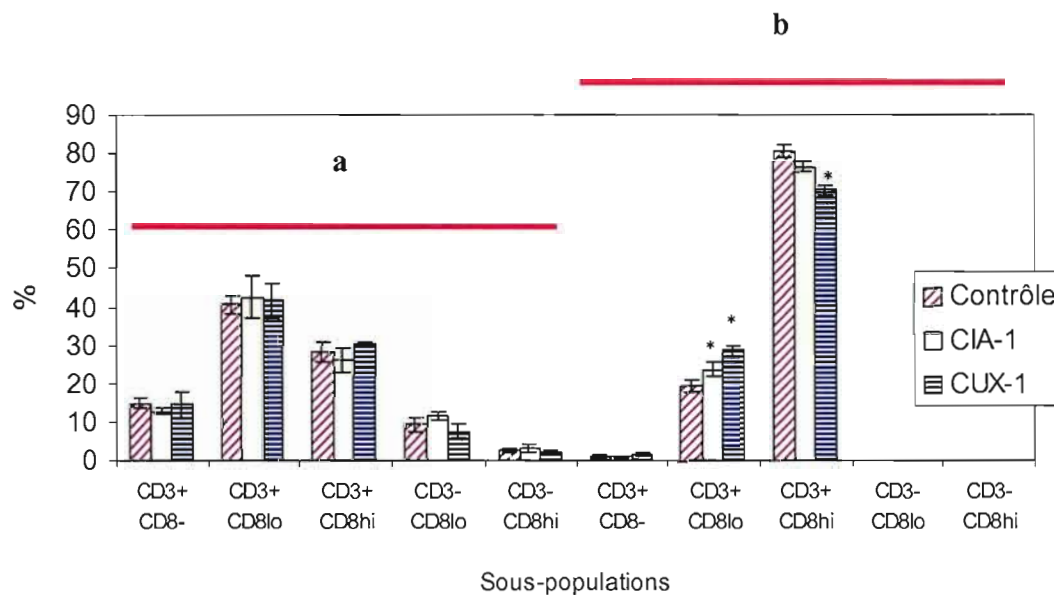


Figure 35: Pourcentages des différentes sous-populations CD3/CD8 pour les lymphocytes de rate témoins et infectés par les virus CUX-1 et CIA-1 dans les régions R1 (FSC/SSC faibles) (a) et R2 (FSC/SSC normaux) (b). Expérience réalisée en triplicata.

\*  $p < 0.05$

### 3.2.2.2.3. Analyse phénotypique des sous-populations lymphocytaires spléniques IgM/TCR $\gamma\delta$ infectées par le CUX-1 et le CIA-1

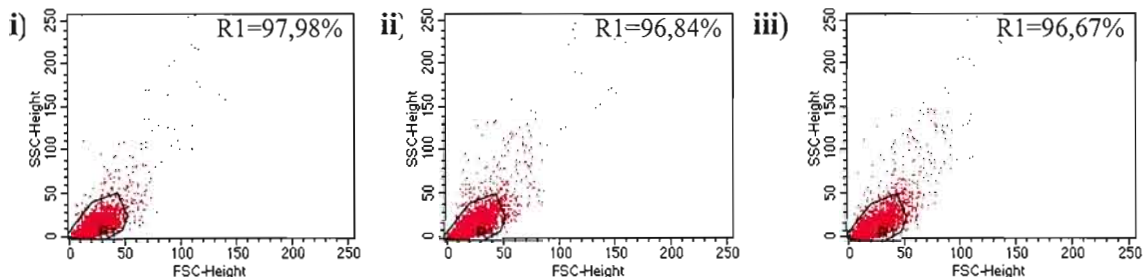
La rate est un organe pouvant contenir d'autres types de cellules que les lymphocytes T et les cellules NK, tels que les lymphocytes B. Afin de caractériser et de séparer les types de lymphocytes spléniques de poussins présents et affectés par la présence virale, des lymphocytes de rate de poussins SPF de 7 jours ont été infectés *in vitro* par le CUX-1 et le CIA-1 et incubés pour une période de 72hrs, en utilisant le surnageant des cellules MDCC comme contrôle (ou cellules non-infectées). Les lymphocytes ont alors été lavés et immunomarkés avec des anticorps anti-IgM-FITC / TCR $\gamma\delta$ -PE et analysés en cytofluorométrie.

Contrairement à la section précédente, l'analyse FSC/SSC n'a pas permis de discriminer clairement entre des cellules ayant des paramètres FSC/SSC différents (Fig. 36A).

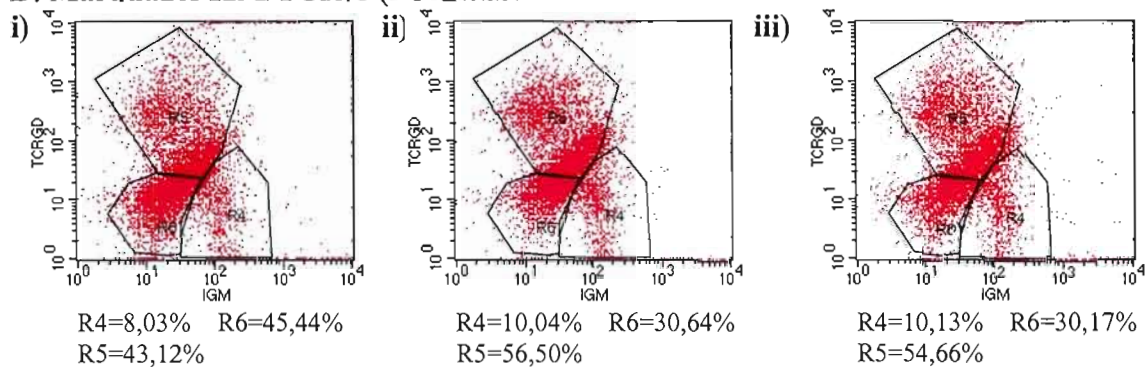
L'analyse multiparamétrique des cellules de cette région a nécessité une analyse plus délicate des sous-populations déterminées par le niveau d'expression des molécules d'IgM et de TCR- $\gamma\delta$  (Figs 36B et C). Pour cela, l'analyse a été effectuée à l'aide de polygones afin de cerner les populations cibles. La figure 36B représente l'analyse de trois sous-populations alors que la figure 36C discrimine deux sous-populations dans la région R3. La région R4 de la figure 36B contient les cellules de phénotype IgM+TCR $\gamma\delta$ -. Cette population ne semble pas affectée de manière significative par l'ajout de virus (Figs 36A, B et 37a). Par ailleurs, la région R6 correspond aux cellules ne présentant aucun des deux phénotypes (IgM-TCR $\gamma\delta$ -) et elle ne varie pas en présence de virus (Figs 36A et B). Par contre, les cellules IgM-TCR $\gamma\delta$ + (région R5 de la figure 36B) augmentent de manière significative ( $p < 0.05$ ) en présence du virus CUX-1 et non pas en présence du virus CIA-1 (Fig. 37a). De plus, deux sous-populations ont été observées selon l'intensité du TCR- $\gamma\delta$  et de



### A) FSC/SSC



### B) Marquages IgM/TCR $\gamma\delta$ (3 régions)



### C) Marquages IgM/TCR $\gamma\delta$ (4 régions)

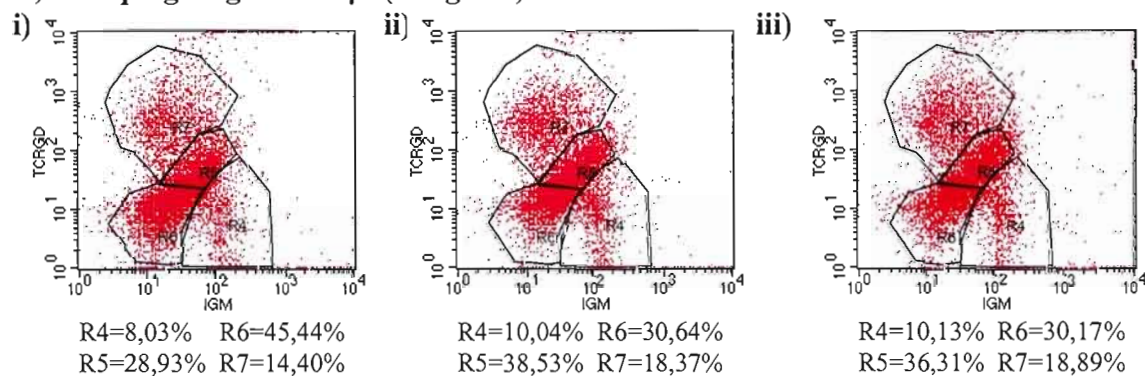


Figure 36: Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), analyse phénotypique des différentes sous populations IgM/TCR $\gamma\delta$  de la région R1 (B) non-infectées (i) et infectés par le virus CUX-1 (ii) ou le CIA-1 (iii) et analyse de la région R5 des figures de B en deux sous-régions (R5 et R7) (C).



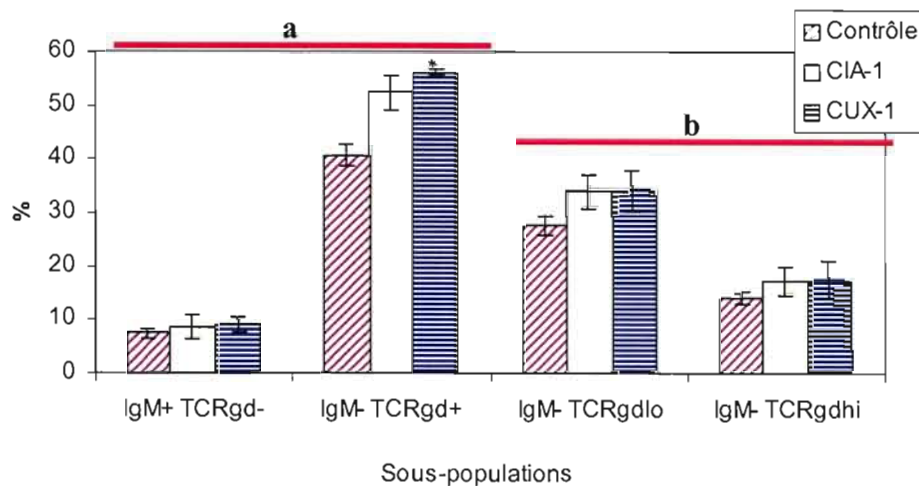


Figure 37 : Pourcentages des différentes sous-populations IgM/TCRγδ pour les lymphocytes de rate témoins et infectés par les virus CUX-1 et CIA-1 ; section à 3 régions donnée par les régions R4 (IgM+TCRγδ-) et R5 (IgM-TCRγδ+) (a) et section à 4 régions donnée par les régions R5 (IgM-TCRγδ<sup>low</sup>) et R7 (IgM-TCRγδ<sup>high</sup>) (b). Expérience réalisée en triplicata.

\* p< 0.05

l'IgM. Cette région (R5 de la figure 36B) a été divisée en deux sous-populations correspondant aux cellules (région R5 de la figure 36C)  $\text{IgM}^{\text{low}}\text{TCR}\gamma\delta^{\text{low}}$  et (région R7 de la figure 36C)  $\text{IgM}^{\text{low}}\text{TCR}\gamma\delta^{\text{high}}$ . Il est possible de remarquer une augmentation, quoique non-significative des cellules de phénotype  $\text{TCR}\gamma\delta^{\text{low}}$  et  $^{\text{high}}$  (Fig. 37b).

### **3.2.3. Détection de l'ADN viral dans les lymphocytes spléniques infectés codant pour la protéine VP3 du CAV.**

Afin de relier les effets apoptotiques et les modifications phénotypiques observées dans les lymphocytes de rate de poussins SPF à la réplication virale, la présence d'ADN viral codant pour la protéine VP3 a été recherchée par un test PCR. La présence d'ADN viral, plus précisément de la région codant pour la VP3, permet d'observer si l'apoptine est produite par les lymphocytes de rate après leur infection. Ces lymphocytes ont été incubés durant 24 hrs avec le traitement déterminé (MDCC, CUX-1 et CIA-1) pour être ensuite lavés et resuspendus dans un nouveau milieu de culture et ré-incubés pour une période de 48 hrs. Ensuite, les surnageants ont été récoltés et congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Afin d'évaluer la présence virale, l'ADN de ces surnageants a été extraite et amplifiée avec les amorces (VP3F et VP3R) de la VP3 pour 35 cycles (cycle optimal pour l'amplification). Ensuite, le produit de PCR a été soumis à une migration dans un gel d'agarose à 1,5%.

Tel que montré dans la figure 38, la présence d'ADN codant pour la VP3 a été observée dans les splénocytes infectés avec l'un ou l'autre des virus provenant autant de poussins d'un jour que de 7 jours (Figs 38 puits 3, 4, 7 et 8). L'ADN viral s'est avéré absent dans les autres échantillons contrôles correspondants aux cellules non-infectés (Témoin négatif) et témoins contrôles négatifs (blancs) (Figure 38 puits 1, 2, 5, 6, 9 et 10).

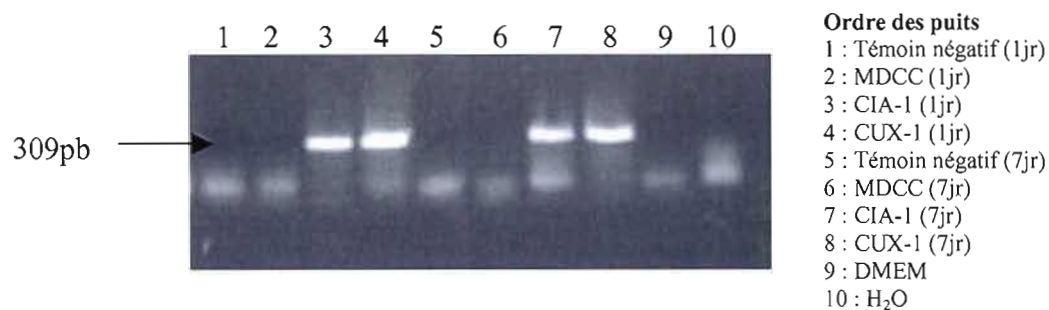


Figure 38 : Détection de l'ADN viral (protéine VP3) dans les surnageants provenant des lymphocytes de rate de poussins SPF d'un jour (puits :1, 2, 3 et 4) et de 7 jrs (puits 5, 6, 7 et 8), incubés 24 hrs avec le surnageant contrôle (MDCC), la souche CUX-1 et la souche CIA-1, lavés à deux reprises avec du RPMI (SVF 20%) et reincubés pour une période de 48 hrs. Les surnageants ont alors été congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'extraction de l'ADN. Résultats représentatifs de trois expériences similaires.

### **3.3. Effets *in vitro* du virus CAV sur les cellules lymphoïdes et myéloïdes de moëlle osseuse de poussins SPF.**

Dans le but de vérifier si les virus CAV peuvent altérer la viabilité et la maturation des cellules de moëlle osseuse *in vitro*, plusieurs expériences ont été effectuées à partir des cellules de moëlle osseuse isolées de poussins SPF de 1 et 7 jours d'âge ou de moëlle osseuse de poussins commerciaux de 1 jour dont les progéniteurs avaient reçu une vaccination. Ainsi, le niveau d'apoptose pouvant être induit par le CAV, la phagocytose et le phénotype des cellules altérées par l'infection ont été analysés.

#### **3.3.1. Poussins SPF d'un jour d'âge**

##### **3.3.1.1. Apoptose de cellules de moëlle osseuse causée par le CAV**

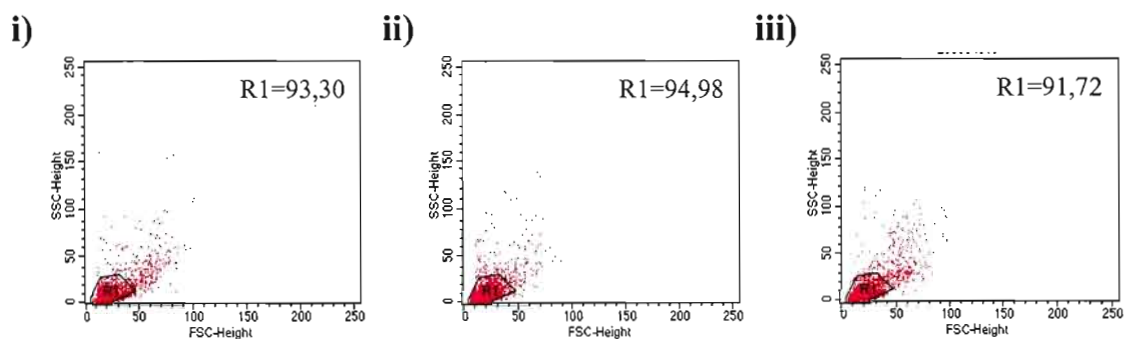
Les cellules de moëlle osseuse de poussins SPF ont été mises en culture et infectées avec les virus CUX-1 à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1 pour une période de 72hrs. Les cellules ont ensuite été marquées par le réactif TUNEL et analysées en cytofluorométrie. Tel que montré dans la figure 39A, peu de différences dans les pourcentages des cellules de moëlle osseuse sont observées entre les cellules non-infectées et les cellules infectées par les deux virus (Figure 39A i à iii). L'état apoptotique de ces cellules est confirmée par le test TUNEL où près de 35% de ces cellules sont positives pour le contrôle tandis que 68% pour les cellules infectées par le CUX-1 et 40% celles infectées par le CIA-1 (Fig. 39B i à iii). L'analyse de trois expériences similaires montrent que les pourcentages de cellules TUNEL+ ont tendance à augmenter en présence du virus CUX-1, mais cet effet n'est pas statistiquement significatif (Fig. 40).

### **3.3.1.2. Analyse phénotypique des sous-populations IgM/Ia des cellules de moëlle osseuse infectées par le virus CUX-1.**

Afin de vérifier si une ou plusieurs populations cellulaires de la moëlle osseuse sont affectées par l'infection virale, des cellules de moëlle osseuse de poussins SPF d'un jour ont été infectées *in vitro* par le virus CUX-1 seulement et incubées pour une période de 72hrs, et le surnageant des cellules MDCC non-infectées a été utilisée comme contrôle. Les cellules de moëlle osseuse ont alors été lavées, immunomarquées avec un anti-IgM-FITC / Ia-PE et analysées en cytofluorométrie.

La figure 41A montre que trois groupes de cellules différant par leur FSC/SSC ont été observées. Les cellules de la région R2 possèdent une taille (FSC) plus forte que celle de la région R1 et une granulosité (SSC) plus forte que celle des cellules des régions R1 et R3. Les cellules de la région R3 sont plus grosses (FSC) que celles de la région R1. Il y a peu de différence dans les pourcentages de cellules dans chacune de ces régions entre les cellules non-infectées (i) et infectées par le virus CUX-1 (ii).

### A) FSC/SSC



### B) TUNEL

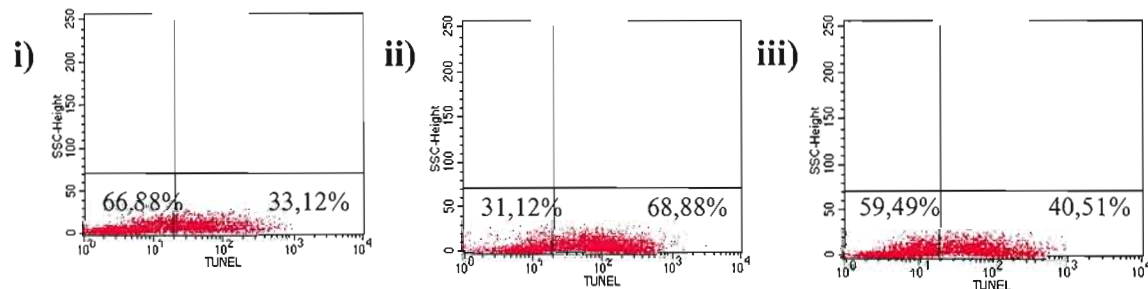


Figure 39: Analyse FSC/SSC (A) des cellules de moëlle osseuse de poussins SPF d'un jour après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii) comparées aux cellules non-infectées (i) et pourcentages des cellules TUNEL positives dans la région sélectionnée (B).

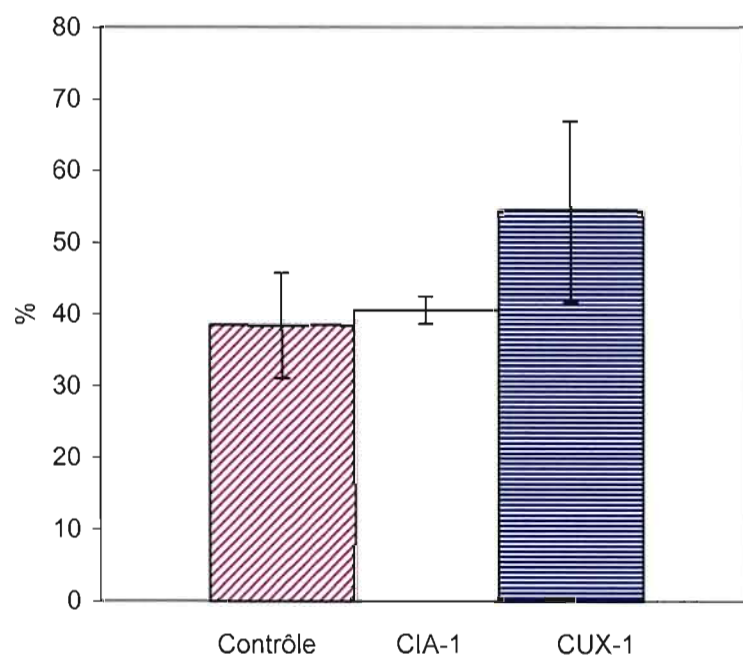
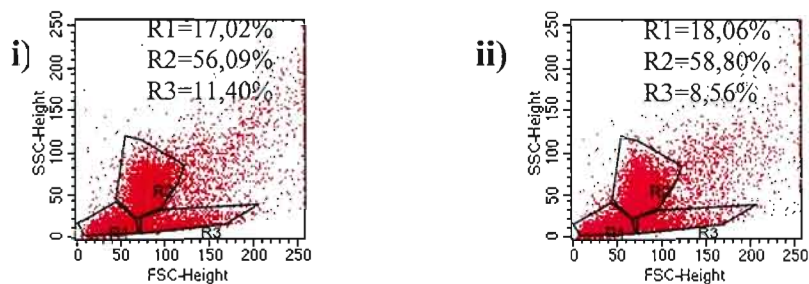


Figure 40 : Pourcentages des cellules de moëlle osseuse TUNEL+ de poussins SPF d'un jour après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 et CIA-1 comparés aux cellules non-infectés. Expérience réalisée en triplicata.

### A) FSC/SSC



### B) Marquages IgM/Ia

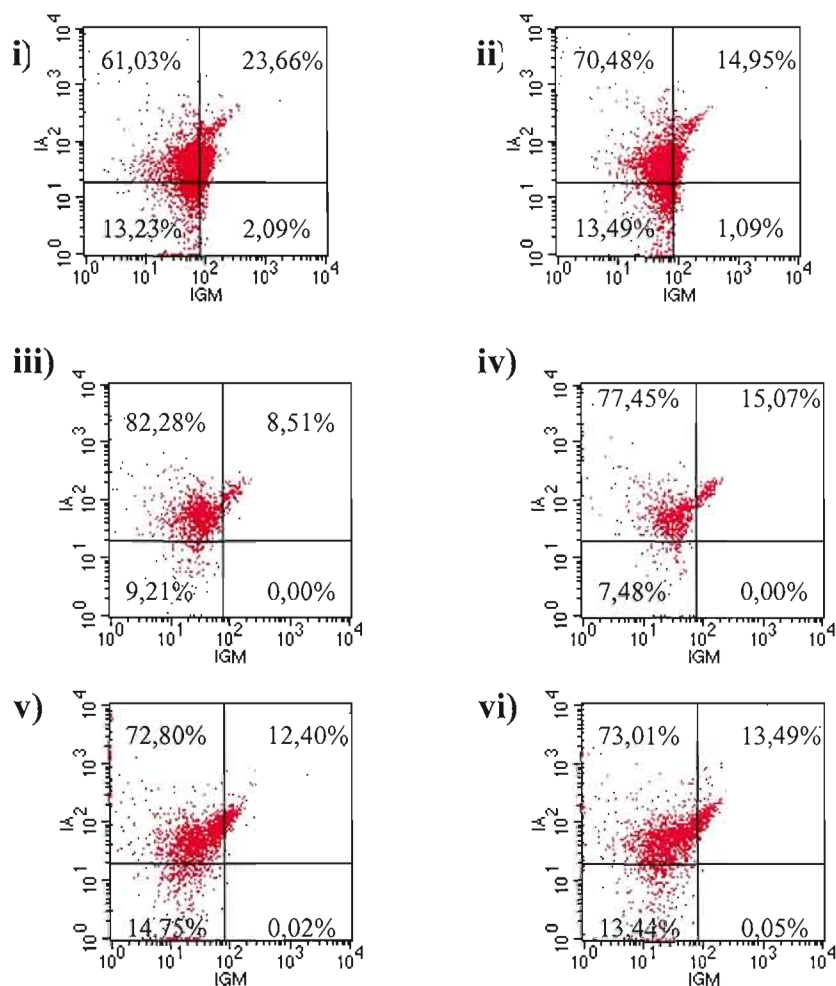


Figure 41 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par la souche virale CUX-1 (ii), et analyse phénotypique des différentes sous populations IgM/Ia (B) pour les cellules de moëlle osseuse des régions R2 (i et ii), R3 (iii et iv) et R1 (v et vi), non-infectées (i, iii et v) ou infectés par le CUX-1 (ii, iv et vi).



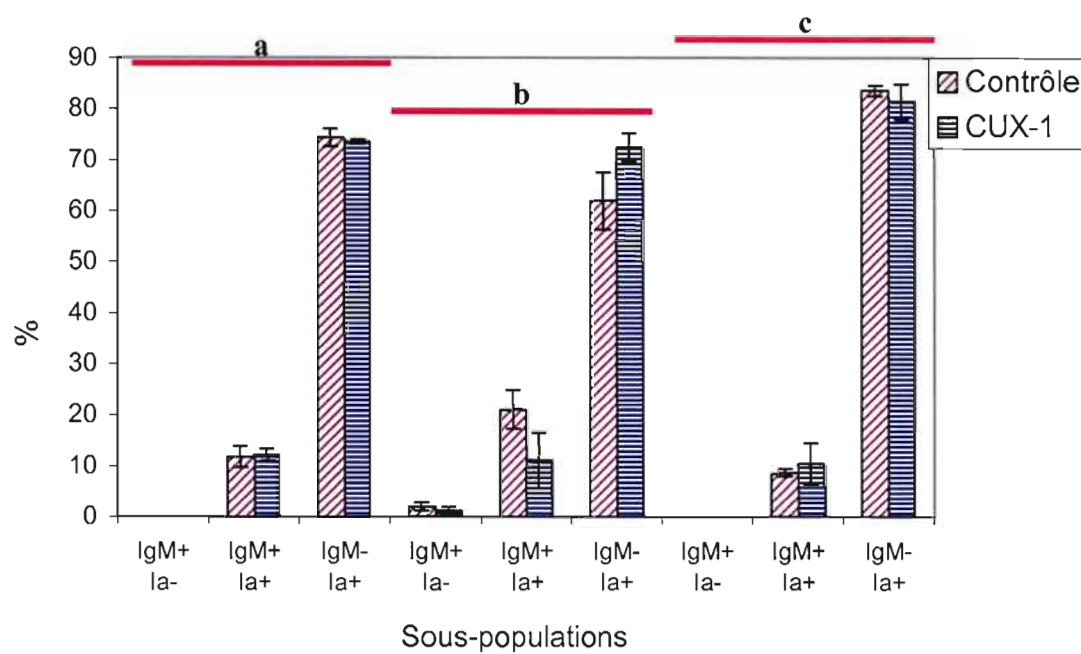


Figure 42 : Pourcentages des différentes sous-populations IgM/Ia pour les cellules de moëlle osseuse non-infectées et infectés par le virus CUX-1 dans les régions (R1) (a), (R2) (b) et (R3) (c). Expérience réalisée en triplicata.

L'analyse multiparamétrique des cellules de ces trois régions révèle plusieurs sous-populations en fonction de l'intensité de l'expression des marqueurs IgM et Ia. Ainsi, des cellules ayant un FSC/SSC élevé (région R2) montrent principalement les phénotypes IgM+Ia+, et IgM-Ia+, autant chez des cellules infectées que non-infectées (Figs 41Bi et 41Bii). Les cellules des phénotypes IgM+Ia- sont peu représentées dans cet échantillon. Les cellules ayant un FSC plus grand mais un SSC plus faible (région R3) montrent la présence surtout du phénotype IgM-Ia+, mais il y a également présence du phénotype IgM+Ia- (Figs 41Biii et Biv). Les cellules de la région R1, ayant un faible FSC/SSC sont de phénotype IgM-Ia+ à environ 72% et IgM+Ia- à 13% (Figs 41Bv et Bvi). Il a été possible d'observer qu'il n'y a aucune différence chez les cellules phénotypées IgM+Ia+ et IgM-Ia+ entre les cellules non-infectées et celles infectées par le virus CUX-1 pour les régions R1 et R3 (Figs 42a et c). Par ailleurs, il été possible d'observer une tendance à la baisse pour les cellules infectées de la région R2 exprimant le phénotype IgM+Ia+ et à l'augmentation pour celles du phénotype IgM-Ia+ (Fig. 42b).

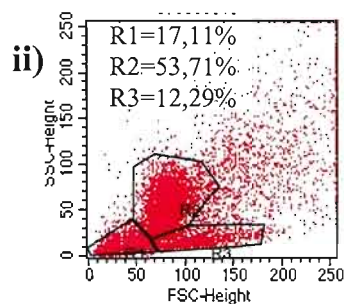
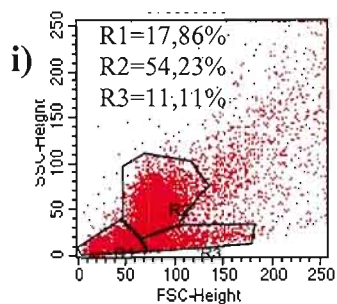
### **3.3.1.3. Analyse phénotypique des sous-populations IgM/CD45 des cellules de moëlle osseuse infectées par le CUX-1**

Le CD45 est une molécule présente chez plusieurs types de cellules précurseurs dans la moëlle osseuse. Afin de vérifier si les tendances observées précédemment chez les populations IgM+Ia+ et IgM-Ia+ sont observables chez les populations IgM/CD45, des cellules de moëlle osseuse de poussins SPF d'un jour ont été infectées *in vitro* par le virus CUX-1 et incubés pour une période de 72hrs, en utilisant le surnageant des cellules MDCC pour les cellules non-infectées. Les cellules de moëlle osseuse ont alors été lavées, immunomarquées avec du IgM-FITC/CD45-PE et analysées en cytofluorométrie.

La figure 43A montre l'analyse FSC/SSC tel que déjà décrit dans la section précédente. Il y a peu de différence dans les pourcentages de cellules dans chacune de ces régions entre les cellules non-infectées (i) et infectées par le CUX-1 (ii).

L'analyse multiparamétrique des cellules de ces trois régions révèle plusieurs sous-populations en fonction de l'intensité de l'expression des marqueurs IgM et CD45. Ainsi, des cellules ayant un FSC/SSC élevé (région R2) montrent principalement le phénotype IgM-CD45<sup>+</sup> et un faible pourcentage de cellules IgM<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> (Figs 43Bi et 41Bii). Les cellules des phénotypes IgM<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> sont peu représentées dans cet échantillon. Les cellules ayant un FSC plus grand mais un SSC plus faible (région R3) montrent la présence surtout du phénotype IgM-CD45<sup>+</sup>, mais il y a également présence du phénotype IgM<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> (Figs 43Biii et Biv). Les cellules de la région R1, ayant un faible FSC/SSC sont de phénotype IgM-CD45<sup>+</sup> à environ 80% et IgM<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> à 5% (Figs 43Bv et Bvi). Il a été possible d'observer qu'il n'y a aucune différence chez les cellules phénotypées IgM<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>, IgM-CD45<sup>+</sup> et IgM<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> entre les cellules non-infectées et celles infectées par le virus CUX-1 et ce, pour les régions R1, R2 et R3 (Figs 42a, b et c).

### A) FSC/SSC



### B) Marquages IgM/CD45

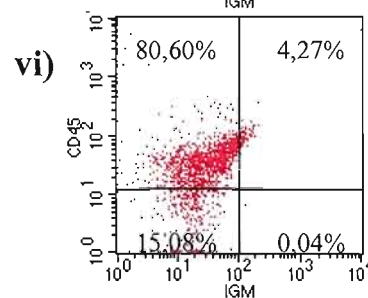
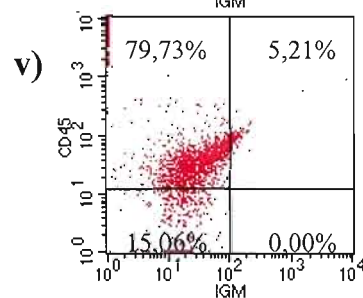
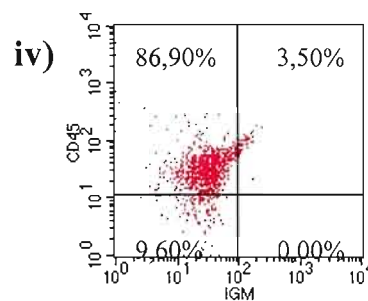
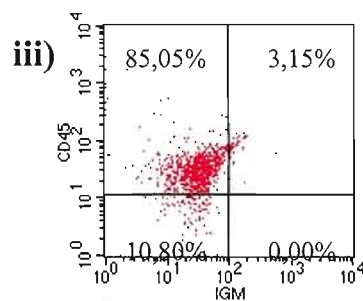
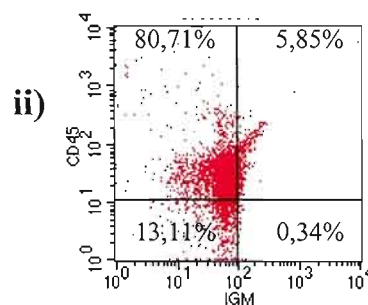
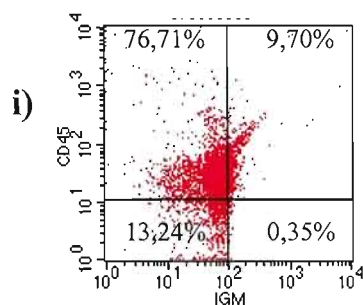


Figure 43 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par la souche CUX-1 (ii), et analyse phénotypique des différentes sous populations IgM/CD45 (B) pour les cellules de moëlle osseuse normales R2 (i et ii), R3 (iii et iv) et apoptotiques R1 (v et vi), non-infectées (i, iii et v) ou infectés par le CUX-1 (ii, iv et vi).

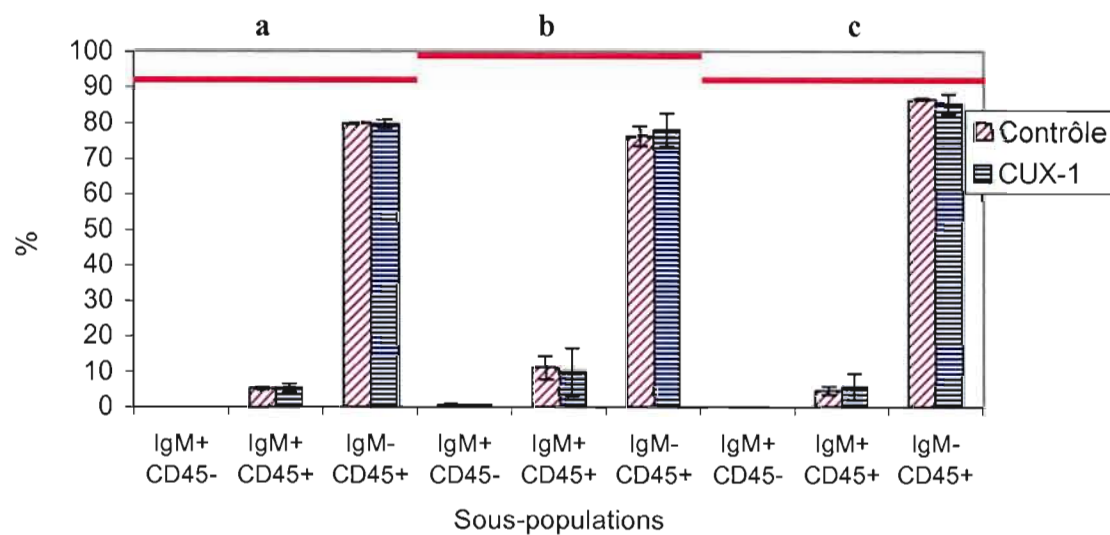


Figure 44 : Pourcentages des différentes sous-populations IgM/CD45 dans les cellules de moëlle osseuse témoins et infectées par le virus CUX-1 dans les régions (R1) (a), (R2) (b) et (R3) (c). Expérience réalisée en triplicata.

### 3.3.2. Poussins SPF âgés de 7 jours

#### 3.3.2.1. Apoptose des cellules de moëlle osseuse causée par le CAV

Il est connu que la susceptibilité des poussins au virus CAV est en diminution dès 7 jours et devient presque nulle vers le 14<sup>e</sup> jour. Afin de vérifier si les cellules de moëlle osseuse de poussins de 7 jours sont moins sensibles à l'apoptose qu'à un jour d'âge, des cellules de moëlle osseuse de poussins SPF ont été mises en culture et infectées avec les virus CUX-1 et CIA-1 à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1 pour des périodes de 72hrs.

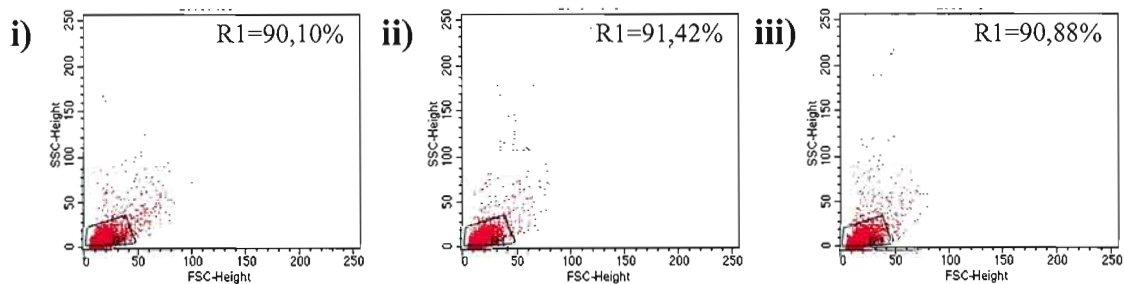
Dans une première expérience, les cellules ont été marquées par le réactif TUNEL et analysées en cytofluorométrie. Tel que montré dans la figure 45A, les cellules se retrouvent à un endroit sur le diagramme de distribution où les paramètres FSC et le SSC sont assez faibles. Peu de différences dans les pourcentages des cellules de moëlle osseuse dans la région R1 sont observées entre les cellules non-infectées et les cellules infectées par les deux virus (Fig. 45A i à iii). Les cellules obtenues montrent des caractéristiques FSC/SSC assez semblables même en présence de virus (Fig. 45A). L'état apoptotique de ces cellules est confirmée par le test TUNEL où une majorité des cellules sont positives (Fig. 45Bi à iii). Cependant le pourcentage de cellules TUNEL+ est plus élevé (Fig. 45Bi et ii) pour les cellules infectées par le CUX-1 et un peu moins pour le virus CIA-1. L'analyse de plusieurs échantillons, par contre, ne permet pas de démontrer statistiquement ces augmentations quoique la tendance à la hausse soit remarquée (Fig. 46).

Dans la deuxième série d'expériences, les cellules ont plutôt été marquées par de l'Annexin V-FITC et de l'IP-PE, suivies d'une analyse en cytofluorométrie afin de distinguer les cellules en apoptose précoce et tardive. Ce marquage a permis de distinguer deux groupes de cellules selon les paramètres FSC/SSC (Fig. 47A). Les cellules ayant un faible FSC/SSC sont représentées par la région R1 et les cellules ayant un FSC/SSC élevé sont représentées par la région R2. Il n'y a pas de différence notable dans les pourcentages des deux régions (R1 et R2) entre les cellules non-

infectées et celles infectées par le CIA-1 ou CUX-1. La région R1 contient majoritairement des cellules en apoptose avancée (IP+AnnexinV+) suivie de cellules en début d'apoptose (IP-AnnexinV+) (Figs 47Biv, v et vi). L'observation du phénotype IP+AnnexinV- dans la région R1 correspond à des cellules fragmentées ou à des corps apoptotiques où l'ADN est marquée par l'IP. En présence du virus CUX-1 le pourcentage des cellules en apoptose avancée (IP+AnnexinV+) tend à diminuer (Fig. 48a). Par ailleurs, il n'y a aucune différence entre les pourcentages des cellules en début d'apoptose infectées par le CUX-1 ou CIA-1 (IP-AnnexinV+), en apoptose avancée (IP+AnnexinV+) ou des débris cellulaires (IP+AnnexinV-) (Fig. 48b).

D'autre part, les cellules de la région R2 sont majoritairement non-apoptotiques de par leur phénotype IP-AnnexinV-, mais il y a aussi des cellules en début d'apoptose, caractérisées par leur positivité à l'Annexin V seulement, et quelques cellules en apoptose avancée positives à l'IP et à l'AnnexinV+ (Figs 47 Bi, ii et iii).

### A) FSC/SSC



### B) TUNEL

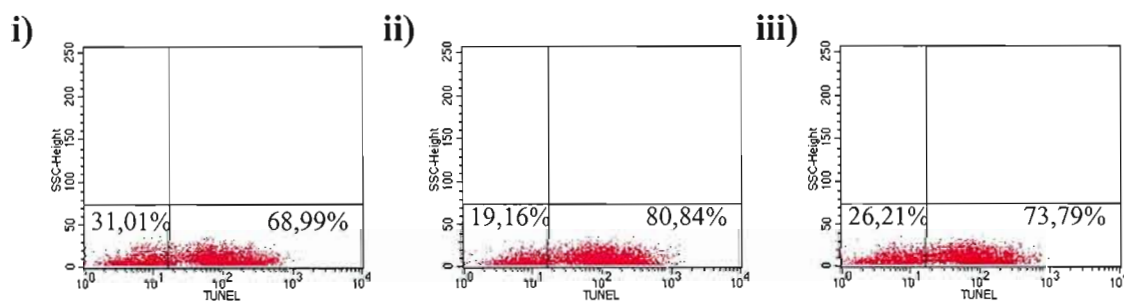


Figure 45 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules de moëlle osseuse de poussins SPF de 7 jrs après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii) comparées aux cellules non-infectées (i) et pourcentages des cellules TUNEL+ dans la région sélectionnée (B).



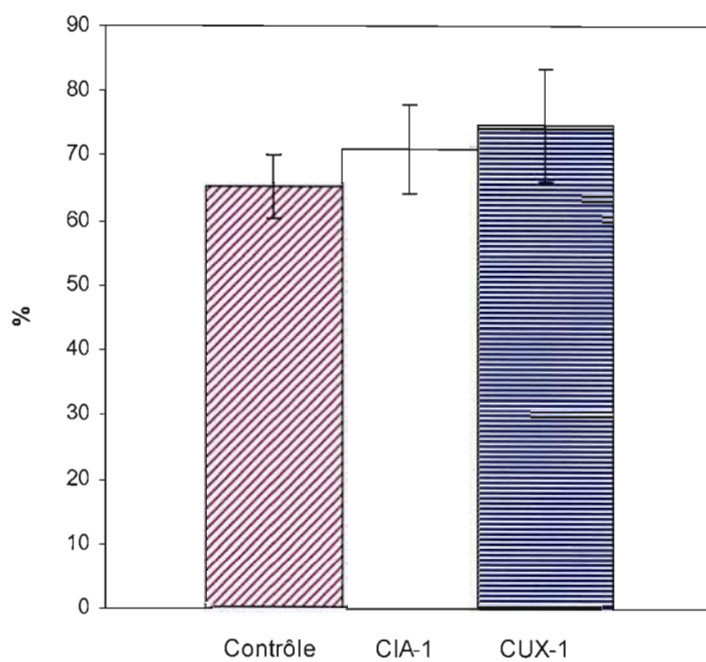
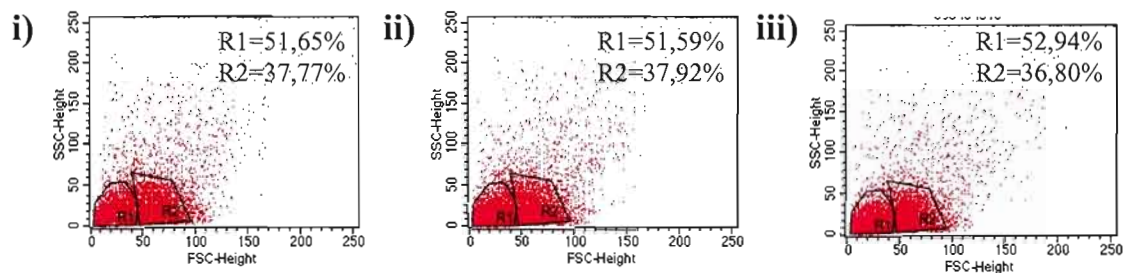


Figure 46: Pourcentages des cellules de moëlle osseuse TUNEL+ de poussins SPF de 7 jrs après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 et CIA-1 comparés aux cellules non-infectées. Expérience réalisée en triplicata.

### A) FSC/SSC



### B) Annexin V/Iodure de Propidium

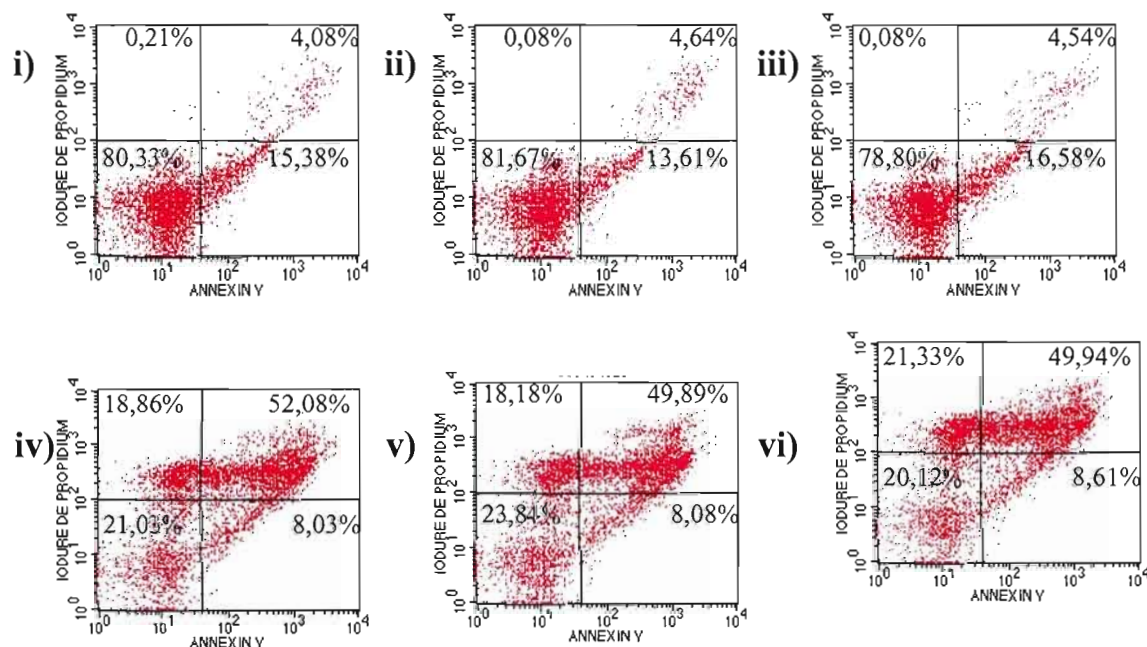


Figure 47 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules de moëlle osseuse de poussins SPF 7jrs après 72hrs d'infection *in vitro* avec les virus CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii) comparés à des cellules non-infectées (i), et analyse multiparamétrique des populations ANNEXIN V/ Iodure de Propidium (B) pour les cellules des régions R2 (i, ii et iii) et R1 (iv, v et vi) en provenance de cellules non-infectées (i et iv), ou infectées avec les virus CUX-1 (ii et v) et CIA-1 (iii et vi).

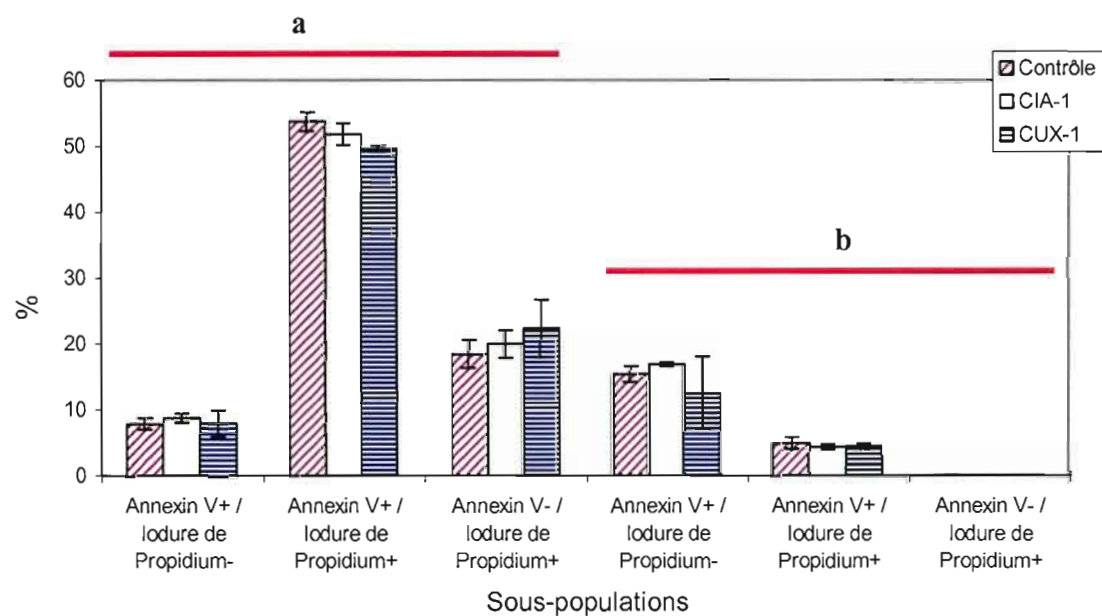


Figure 48: Pourcentages des différentes sous-populations ANNEXIN V/Iodure de Propidium pour les cellules de moëlle osseuse non-infectées et infectées par les virus CUX-1 et CIA-1 dans les régions R1 (a) et R2 (b). Expérience réalisée en triplicata.

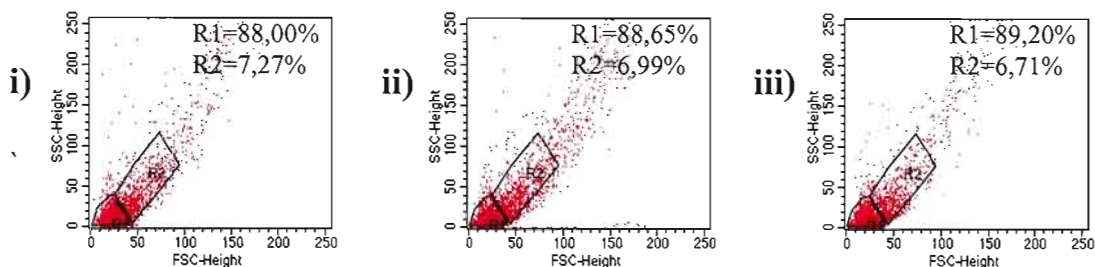
### 3.3.2.2. Analyse phénotypique des sous-populations IgM/Ia des cellules de moëlle osseuse infectées par les virus CUX-1 et le CIA-1

Afin de vérifier si une ou plusieurs populations cellulaires présentatrices d'antigènes de la moëlle osseuse peuvent être affectées par l'infection virale, des cellules de moëlle osseuse de poussins de 7 jours SPF ont été infectés *in vitro* par les virus CIA-1 ou le CUX-1 et incubés pour une période de 72hrs, en utilisant le surnageant des cellules MDCC pour les cellules non-infectées. Les cellules de moëlle osseuse ont alors été lavées, immunomarquées avec du IgM-FITC / Ia-PE et analysées en cytofluorométrie.

La figure 49A montre l'analyse FSC/SSC de ces cellules où deux groupes de cellules différant par leur FSC/SSC ont été observées. Les cellules de la région R2 possèdent une taille (FSC) et une granulosité (SSC) plus forte que celle de la région R1. Il y a peu de différence détectable dans les pourcentages de cellules dans chacune de ces régions entre les cellules non-infectées (i) et infectées par le CUX-1 (ii) et le CIA-1 (iii).

L'analyse multiparamétrique des cellules de ces deux régions révèle que des cellules ayant un FSC/SSC élevé (région R2) montrent principalement le phénotype IgM-Ia<sup>+</sup> suivi du phénotype IgM+Ia<sup>+</sup> et ce, autant chez des cellules infectées que non-infectées (Figs 49Bi, Bii et Biii). Les cellules de phénotypes IgM+Ia<sup>-</sup> sont peu représentées dans cette région. Les cellules de la région R1, ayant un faible FSC/SSC sont majoritairement de phénotype IgM-Ia<sup>+</sup> (Figs 49Biv, Bv et Bvi). Il n'y a aucune différence dans les pourcentages des différentes populations entre les cellules non-infectées et les cellules infectées, et ce pour les régions R1 et R2 (Figs 50a et b).

### A) FSC/SSC



### B) Marquages IgM/Ia

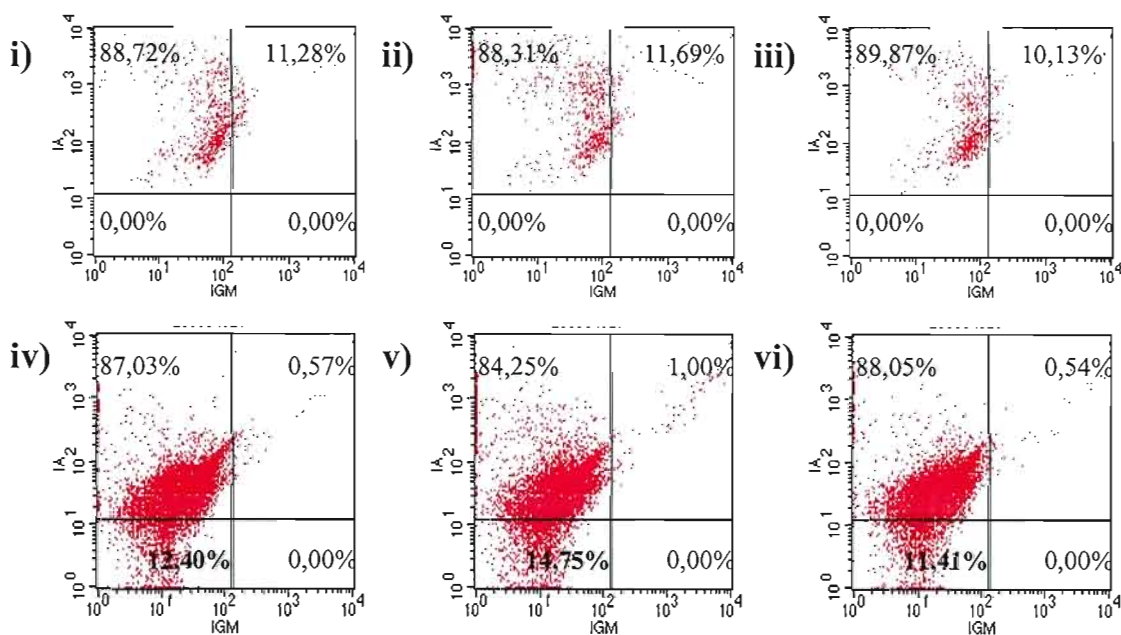


Figure 49 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), et analyse phénotypique des différentes sous populations IgM/Ia (B) pour les cellules de moëlle osseuse normales R2 (i, ii et iii) et apoptotiques R1 (iv, v et vi), non-infectées (i et iv) ou infectés par les virus CUX-1 (ii et v) ou CIA-1 (iii et vi).

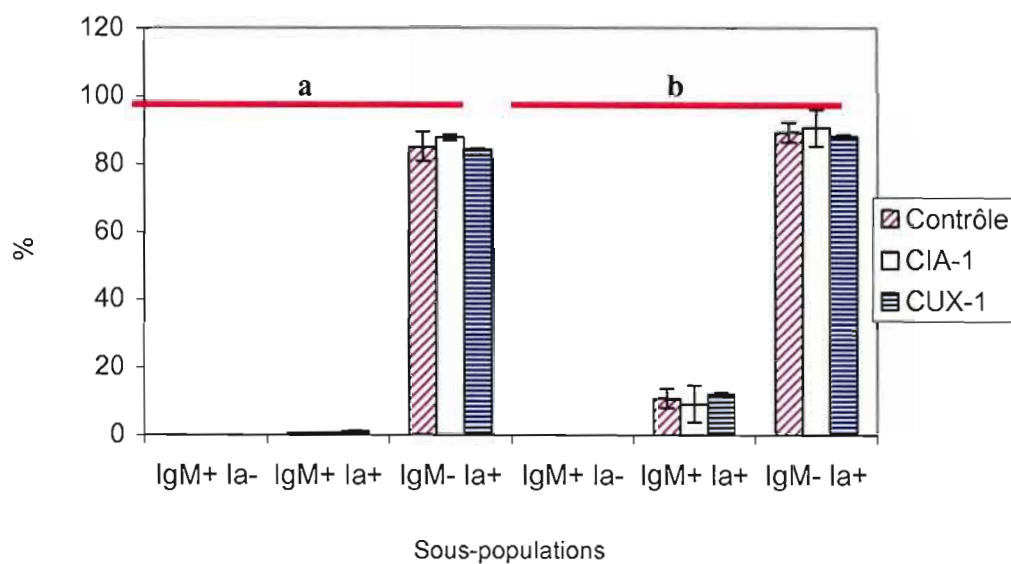


Figure 50 : Pourcentages des différentes sous-populations IgM/Ia pour les cellules de moëlle osseuse non-infectées et infectées par les virus CUX-1 ou le CIA-1, dans les régions R1 (a) et R2 (b). Expérience réalisée en triplicata.

### 3.3.2.3. Analyse phénotypique des sous-populations IgM/CD45 des cellules de moëlle osseuse infectées par le CUX-1 et le CIA-1

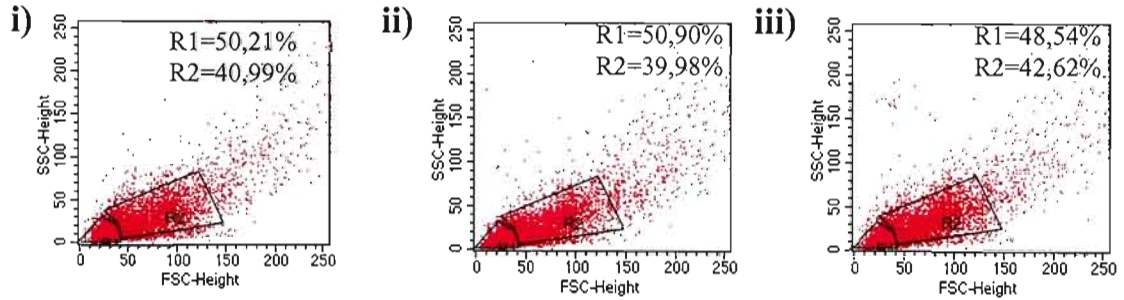
Afin de vérifier si les populations cellulaires de la moëlle osseuse exprimant le CD45 sont affectées par l'infection virale, des cellules de moëlle osseuse de poussins de 7 jours SPF ont été infectés *in vitro* par les virus CIA-1 ou le CUX-1 et incubés pour une période de 72hrs, en utilisant le surnageant des cellules MDCC comme contrôle (ou cellules non-infectées). Les cellules de moëlle osseuse ont alors été lavées, immunomarquées avec du IgM-FITC/CD45-PE et analysées en cytofluorométrie.

Tel que montré par la figure 51A, l'analyse FSC/SSC des deux groupes de cellules différant par leur FSC/SSC, tel que décrit à la section précédente, n'a révélé aucune différence dans les pourcentages de cellules dans chacune de ces régions entre les cellules non-infectées (i) et infectées par les virus CUX-1 (ii) et le CIA-1 (iii).

L'analyse multiparamétrique des cellules de ces deux régions révèle que chez les cellules ayant un FSC/SSC élevé (région R2), le phénotype IgM-CD45<sup>+</sup> est prédominant autant chez des cellules infectées que non-infectées (Figs 51Bi, Bii et Biii). Les cellules de phénotypes IgM<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> ou même IgM<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> sont peu représentées dans cet échantillon. Les cellules de la région R1, tout comme celles de la région R2, sont majoritairement de phénotype IgM-CD45<sup>+</sup>, toutefois on y retrouve également une population IgM<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> (Figs 51Biv, Bv et Bvi). Il n'y a aucune différence entre les pourcentages de ces populations entre les cellules infectées et non-infectées pour la région R1 (Fig. 52a). Cependant, les cellules IgM<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> dans la région R2 augmentent en présence de CUX-1 et alors que les cellules IgM-CD45<sup>+</sup> diminuent ( $p < 0.05$ ) (Fig. 52b).



### A) FSC/SSC



### B) Marquages IgM/CD45

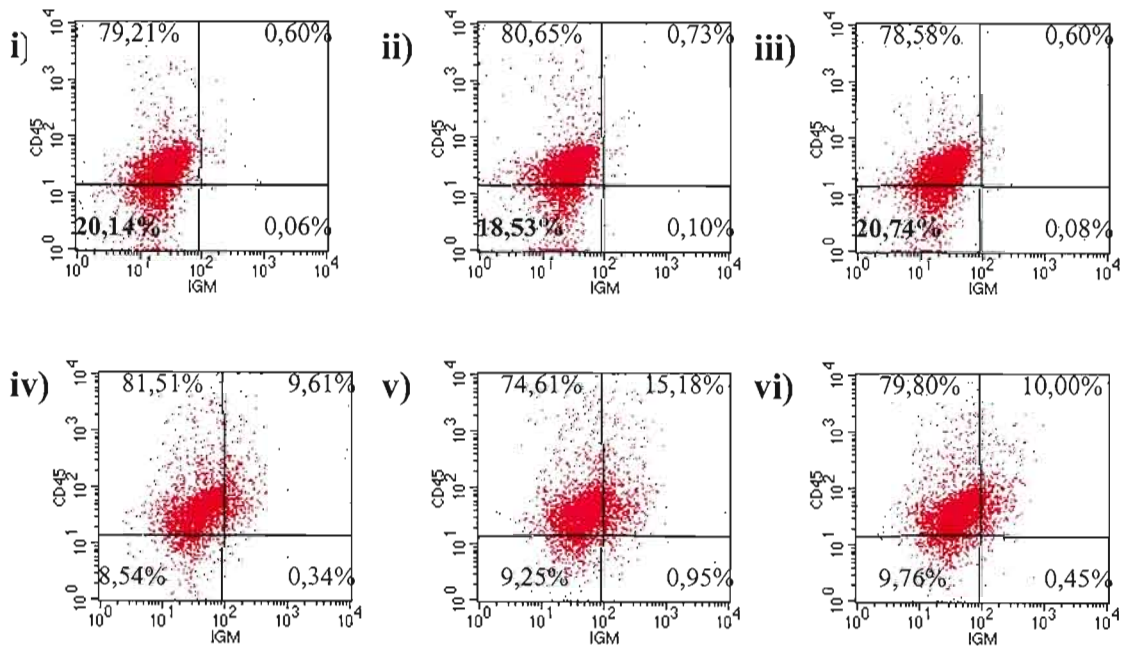


Figure 51 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules non-infectées (i) et infectées par les souches CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii), et analyse phénotypique des différentes sous populations IgM/CD45 (B) pour les cellules de moëlle osseuse normales R2 (i, ii et iii) et apoptotiques R1 (iv, v et vi), non-infectées (i et iv) ou infectés par les virus CUX-1 (ii et v) ou CIA-1 (iii et vi).



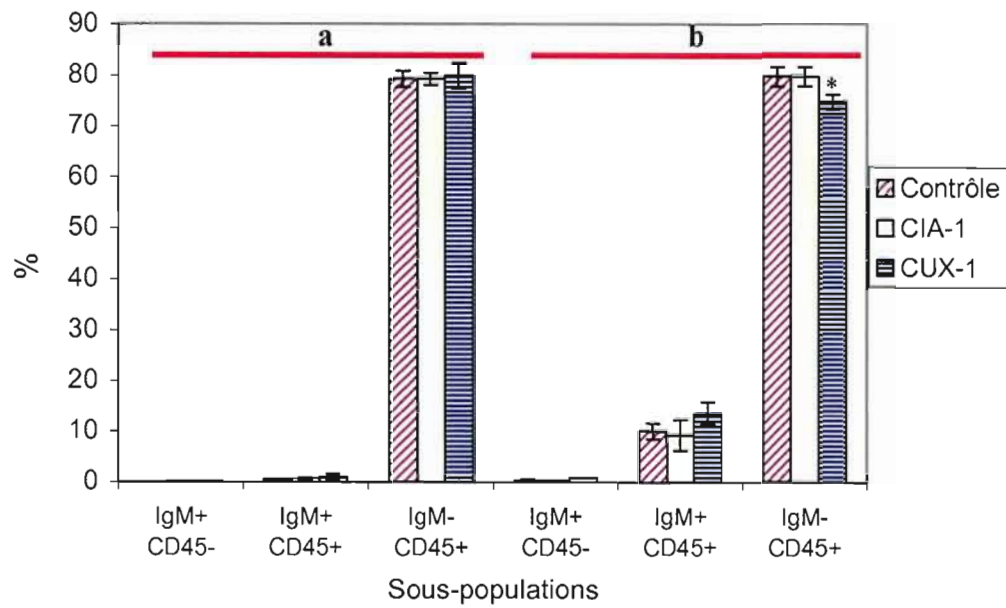


Figure 52 : Pourcentages des différentes sous-populations IgM/CD45 pour les cellules de moëlle osseuse non-infectées et infectés par les virus CUX-1 ou CIA-1, dans les régions R1 (a) et R2 (b). Expérience réalisée en triplicata.

\*  $p < 0.05$

### **3.3.3. Détection de l'ADN viral dans les cellules de moëlle osseuse aviaires infectées codant pour la protéine VP3 du CAV.**

Afin de vérifier s'il y a eu expression de la VP3 et réplication virale malgré l'absence d'apoptose induite et le peu de variations phénotypiques chez les cellules de moëlle osseuse infectées, la présence de l'ADN viral codant pour la protéine VP3 a été recherchée par un test PCR. Les cellules de moëlle osseuse ont été incubées durant 24 heures avec les différentes suspensions virales ou non-infectées (MDCC, CUX-1 et CIA-1) pour être ensuite lavées, resuspendues dans un nouveau milieu de culture et re-incubées pour une période de 48 hrs. Ensuite, les surnageants ont été récoltés et congelés à -80°C. L'ADN de ces surnageants a été extrait et amplifié avec les amorces (VP3F et VP3R) de la VP3 pour 35 cycles (cycle optimal pour l'amplification). Ensuite, le produit de PCR a été soumis à une migration dans un gel d'agarose à 1,5% et relevé par rayons ultraviolets.

Tel que montré dans les figures 53A et B, la présence d'ADN codant pour la VP3 a été observée dans les cellules de moëlle osseuse en provenance des deux groupes de poussins SPF (1 et 7 jours) infectés avec l'un ou l'autre des souches virales (Figs 53A puits 5 et 6; 53B puits 5 et 6). L'ADN viral s'est avéré absent dans les autres échantillons contrôles correspondants aux cellules non-infectées (Témoin négatif) et aux témoins contrôle négatifs (Figure 53A puits 1, 2, 3 et 4; 53B puits 1, 2, 3 et 4).

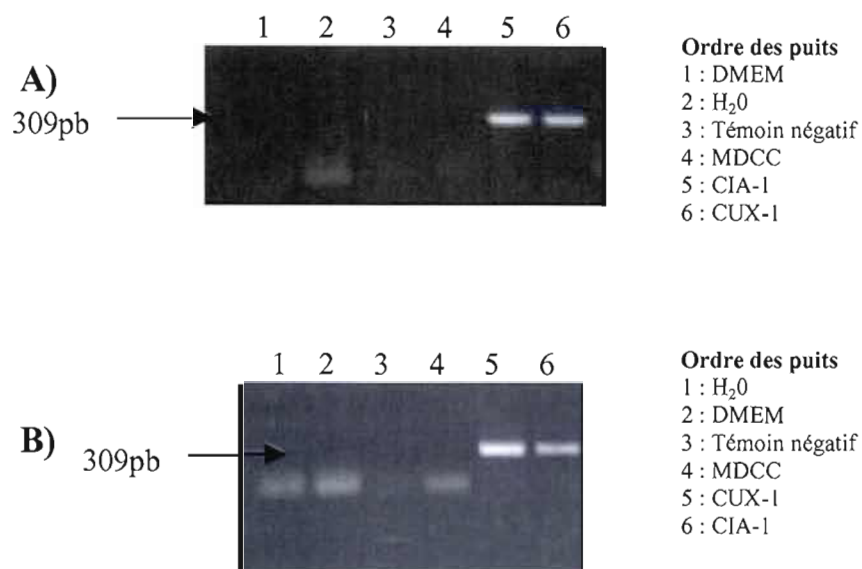


Figure 53 : Détection de l'ADN viral (protéine VP3) dans les surnageants provenant de cellules de moëlle osseuse de poussins SPF 1jr (A) et 7jrs (B), incubées 24heures avec le surnageant contrôle (MDCC), la souche CUX-1 et la souche CIA-1, lavées à deux reprises avec du RPMI (SVF 20%) et réincubées pour une période de 48heures. Les surnageants ont alors été congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'extraction de l'ADN. Résultats représentatifs de trois expériences similaires.

### 3.4. Effets *in vitro* des virus CAV sur la phagocytose par les cellules adhérentes de moëlle osseuse de poussins d'un jour.

Afin de vérifier si l'activité phagocytaire des cellules myéloïdes adhérentes de la moëlle osseuse peut être affectée par la présence virale, des cellules de moëlle osseuse de poussins commerciaux d'un jour ont été infectées durant 72 heures *in vitro* par le CAV et stimulées avec du LPS. Les cellules ont été incubées avec des billes fluorescentes à 39°C durant 120 minutes sous agitation et lavées avec une solution de BSA (2%). Ensuite les niveaux de fluorescence des cellules ont été analysés par cytofluorométrie.

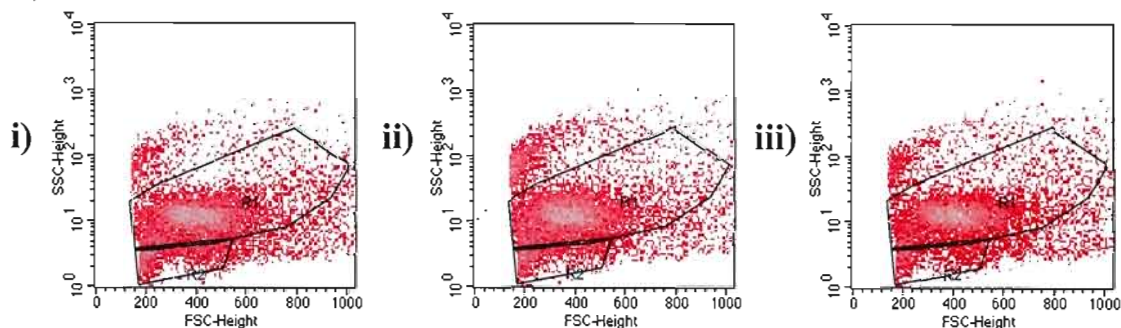
Tel que montré par la figure 54A, les cellules adhérentes de moëlle osseuse non-stimulées par le LPS se séparent en deux groupes; l'un ayant un plus grand FSC/SSC (la région R1) et l'autre ayant un FSC/SSC plus faible (région R2). L'analyse de la fluorescence émise par ces cellules ayant phagocyté des billes est montré par la figure 54Bi Bii et Biii pour la région R1 et dans la figure 54B iv, v et vi pour la région R2. Il est possible de constater que trois pics de fluorescence sont présents, le premier pic correspond à l'ingestion d'une bille fluorescente, le second pic à deux billes et le dernier pic à trois billes et plus. Les résultats indiquent que les deux virus ont augmenté les pourcentages de la région R1 ayant phagocyté une, deux et trois billes et plus. La stimulation de la phagocytose semble plus élevée en présence de la souche CUX-1 que la souche CIA-1. Lorsque les cellules sont mises en présence de LPS (Figs 55A et B), la phagocytose est encore plus stimulée par les deux virus. Par contre, il a été possible d'observer qu'il n'y a pas eu de fluorescence émise par les cellules de la région R2 (Figs 54Biv, v et vi et 55Biv, v et vi).

L'analyse des expériences réalisées en triplicata confirme ces observations puisque les pourcentages de phagocytose de billes fluorescentes sont plus élevés chez les cellules infectées par les deux souches de CAV lorsque comparés à celui des cellules contrôles (Fig 56). Ainsi, sans LPS le pourcentage de cellules ayant

phagocyté une bille et significativement ( $p < 0.05$ ) plus élevé chez les cellules infectées par le CIA-1 seulement (Fig. 56 M1/Sans LPS). Par contre, chez les cellules stimulées avec du LPS, les pourcentages de cellules ayant phagocyté une bille est significativement ( $p < 0.05$ ) plus élevé pour les cellules ayant été infectées aussi par le CUX-1. Chez les cellules ayant phagocyté deux billes, il n'y a aucune différence entre les cellules non-stimulées infectées et contrôles, contrairement aux cellules stimulées au LPS où la présence virale (CUX-1 ou CIA-1) entraîne une augmentation de la phagocytose ( $p < 0.05$ ) (Fig. 56). Par contre, aucune différence n'est mise en évidence entre les cellules non-infectées et infectées lorsque les cellules ont phagocyté trois billes et plus (Fig 56). Les pourcentages de phagocytose de 3 billes et plus chez les cellules stimulées au LPS semblent augmenter chez les cellules infectées par le CUX-1, mais sont significativement plus élevés chez les cellules infectées par le CIA-1 (Fig 56). Les cellules stimulées ont donc phagocyté plus de billes que les cellules non-stimulées et les virus CAV ont augmenté la capacité de phagocytose des cellules isolées de la moëlle osseuse.

# 1) Sans LPS

## A) FSC/SSC



## B) Phagocytose

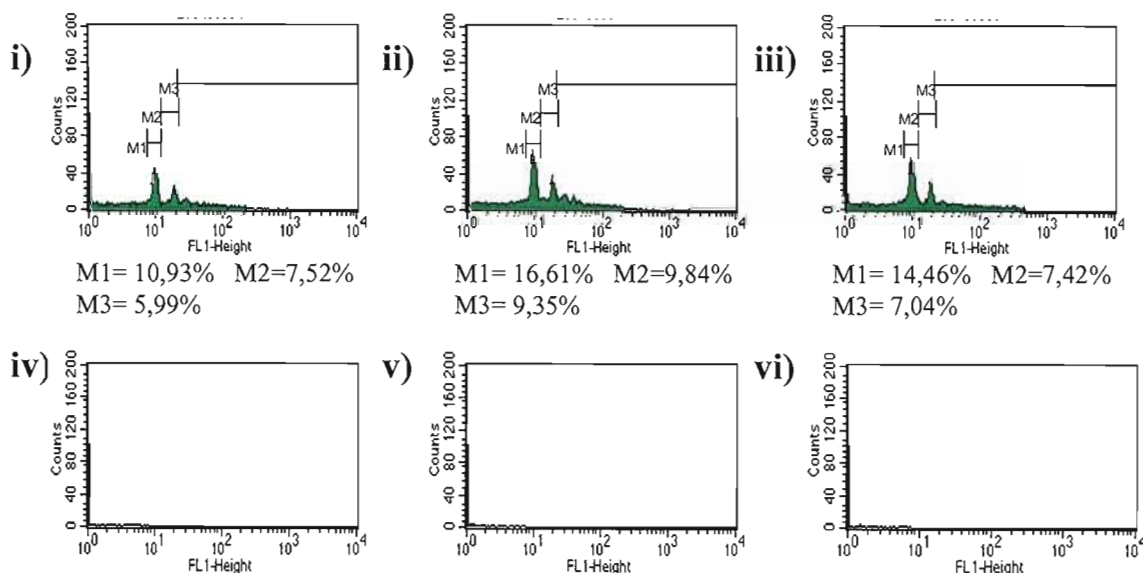
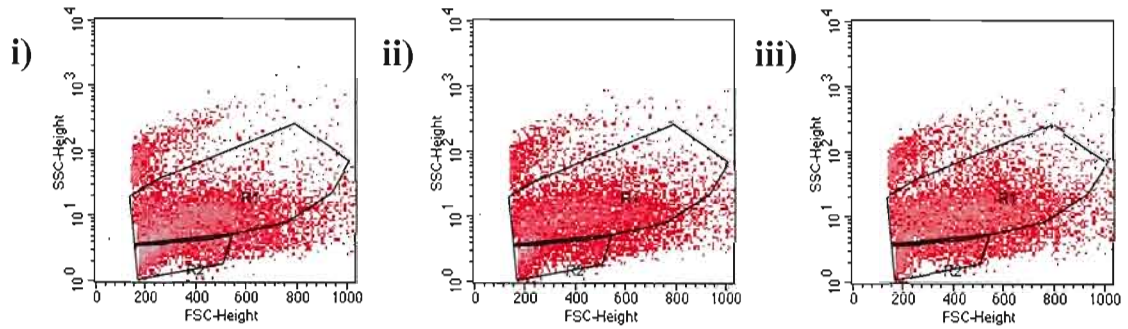


Figure 54 : Analyse FSC/SSC (A) des cellules de moëlle osseuse de poussins commerciaux d'un jour non-stimulées et infectés *in vitro* avec les virus CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii) durant 72 hrs, et intensité de la fluorescence (B) des cellules ayant phagocyté 1 bille (M1), 2 billes (M2) et 3 billes et plus (M3) provenant des cellules de la région R1 (i, ii et iii) et de la région R2 (iv, v et vi) non-infectées (i et iv) et infectées par les virus CUX-1 (ii et v) ou CIA-1 (iii et vi).

## 2) Avec LPS

### A) FSC/SSC



### B) Phagocytose

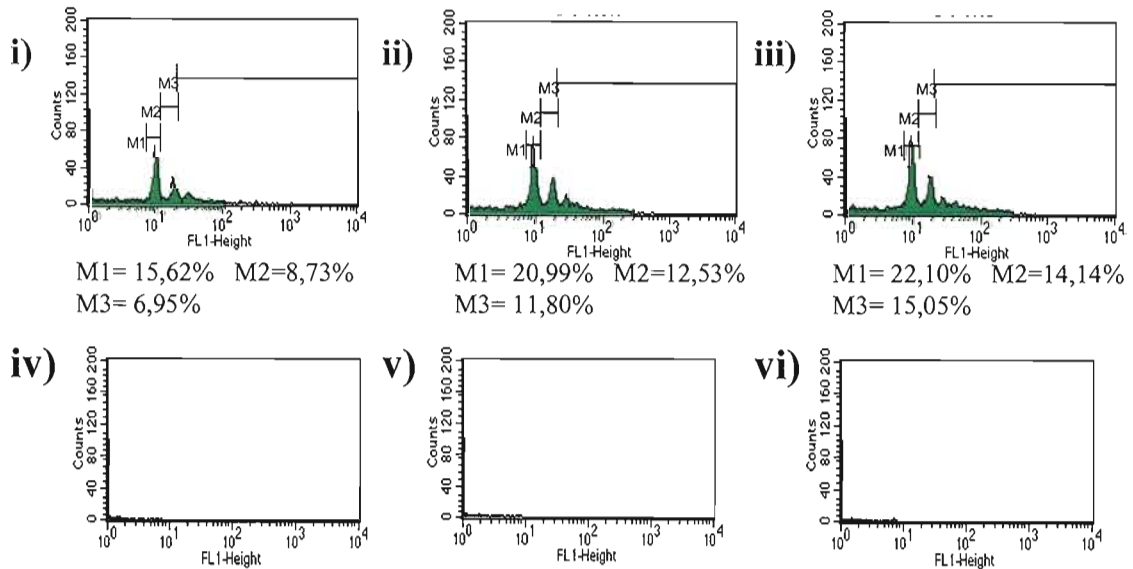


Figure 55: Analyse FSC/SSC (A) des cellules de moëlle osseuse de poussins commerciaux d'un jour stimulées avec du LPS et infectées *in vitro* avec les virus CUX-1 (ii) et CIA-1 (iii) durant 72 hrs, et intensité de la fluorescence (B) des cellules ayant phagocyté 1 bille (M1), 2 billes (M2) et 3 billes et plus (M3) provenant des cellules de la région R1 (i, ii et iii) et de la région R2 (iv, v et vi), non-infectées (i et iv) et infectées par les virus CUX-1 (ii et v) ou CIA-1 (iii et vi).

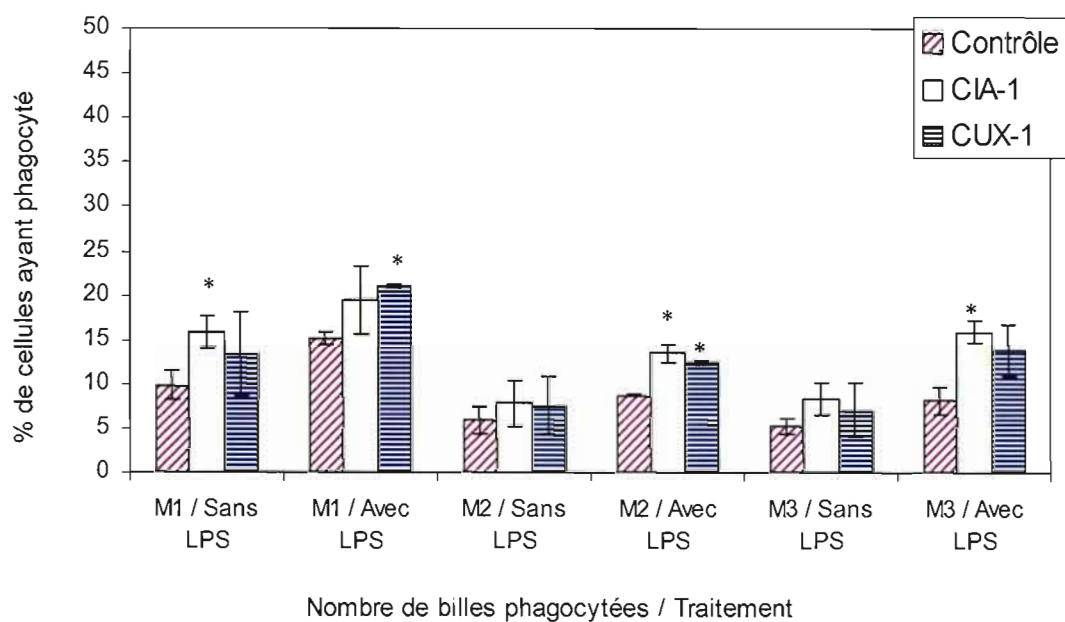


Figure 56 : Pourcentages des cellules ayant phagocyté une bille (M1), deux billes (M2) et trois billes et plus (M3) ou non-stimulées ou non avec du LPS et infectées avec les virus CIA-1 ou CUX-1. Expérience réalisée en triplicate.

\*  $p < 0.05$



### 3.5 Effets *in vitro* du CAV sur la transformation blastique par les cellules du thymus chez les poussins SPF 1 jour et de la rate chez les poussins SPF 7 jours.

Dans le but de vérifier si les virus CAV peuvent stimuler ou inhiber l'activité métabolique ou la division cellulaire des thymocytes ou des lymphocytes de rate *in vitro*, plusieurs expériences ont été effectuées à partir de thymocytes isolés de poussins SPF de 1 et 7 jours d'âge ou de thymus de poussins commerciaux de 1 jour dont les progéniteurs avaient reçu une vaccination, ainsi qu' à partir de lymphocytes de rate de poussins SPF 7 jours.

Les thymocytes de poussins SPF et commerciaux de 1 jour et SPF de 7 jours ainsi que les lymphocytes de rate de poussins SPF de 7 jours ont été mis en culture en absence et en présence de 30µg/ml de concanavaline A (ConA) et infectés avec les virus CUX-1 et CIA-1 à une multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1 pour des périodes de 72hrs. Après 14 hrs d'infection, une solution de MTS/PMS a été ajoutée et les lectures de l'absorbance ont été effectuées à 490nm 4 hrs plus tard à l'aide d'un lecteur de microplaques. Les lectures successives ont été prises environ aux 12 heures jusqu'à concurrence de 72 heures.

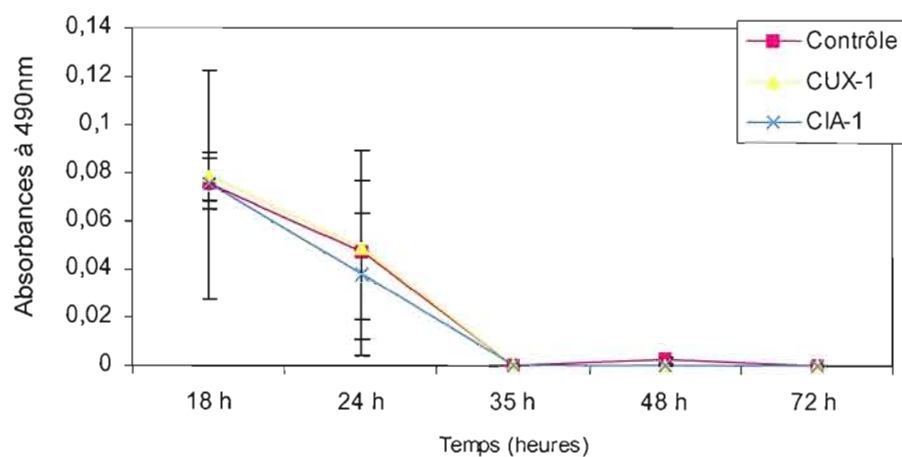
Tel que montré dans la figure 57A, l'activité métabolique des thymocytes de poussins SPF d'un jour non-stimulés par la ConA ne varie pas significativement entre les cellules non-infectées et infectées par l'un ou l'autre des virus. La stimulation des thymocytes par la ConA ne modifie pas les effets des souches virales puisqu'aucune hausse ou diminution de l'activité métabolique par rapport aux cellules non-infectées n'est mise en évidence (Fig. 57B) malgré une tendance à la baisse plus marquée chez les cellules infectées. Par contre, la diminution de l'activité métabolique en moins de 36 hrs environ et ce, pour les contrôles et les échantillons infectés en présence et en absence de ConA (Fig. 57), suggère que les thymocytes supportent mal la culture *in vitro*. Des résultats similaires sont obtenus chez des thymocytes de poussins

commerciaux d'un jour ou des thymocytes de poussins âgés de 7 jours (résultats non montrés).

Par ailleurs, les lymphocytes de rate supportent mieux la culture *in vitro*, car le niveau basal d'activité métabolique est plus élevé que celui observée chez les thymocytes (Figs 57 et 58). Aussi, en absence de ConA, l'activité métabolique des lymphocytes spléniques infectés avec les virus CIA-1 et CUX-1 est significativement plus élevée ( $p < 0,05$ ) comparée au contrôle à partir de 48 heures (Fig. 58 A). Par contre, après la stimulation par la ConA, il n'y a pas de différence significative entre les cellules non-infectées et les lymphocytes infectés (Fig. 58B).

### Thymus SPF 1jr

#### A) Sans ConA



#### B) ConA 30µg/ml

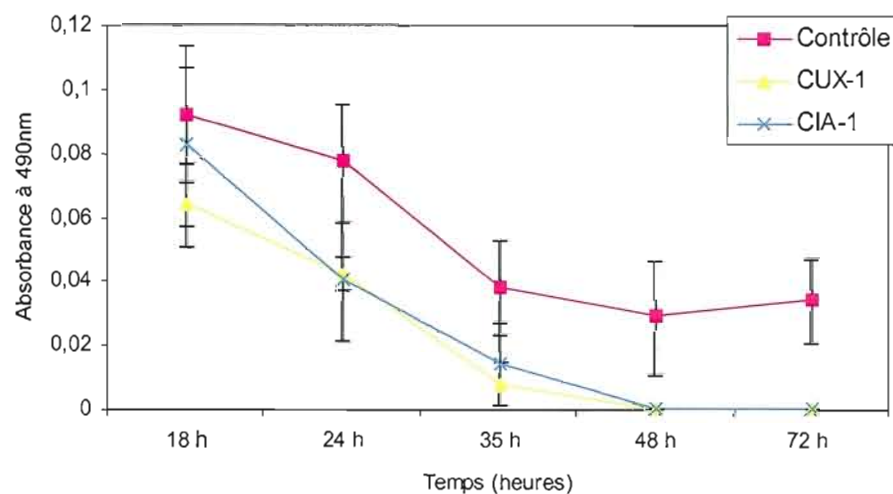
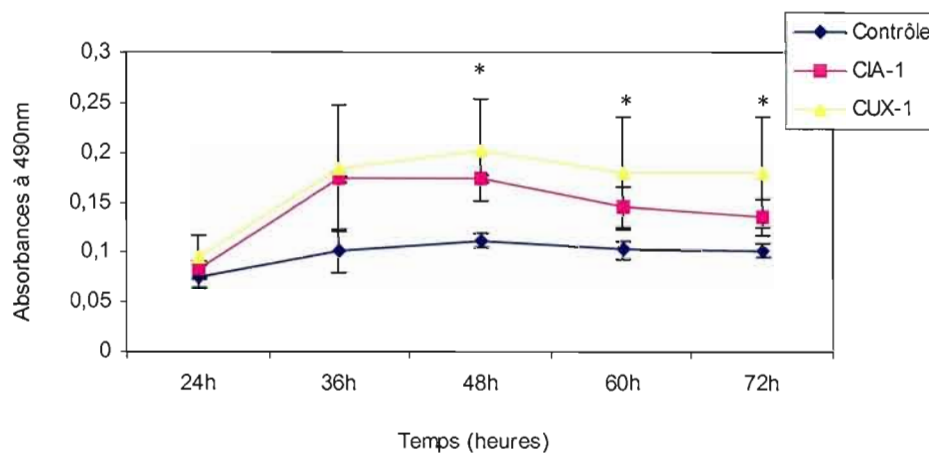


Figure 57 : Stimulation blastique des thymocytes de poussins SPF d'un jour en culture, non-infectés et infectés avec les virus CIA-1 ou le CUX-1 en absence (A) ou en présence de 30µg/ml de ConA (B).

Rate SPF 7 jrs

A) Sans ConA



B) ConA 30µg/ml

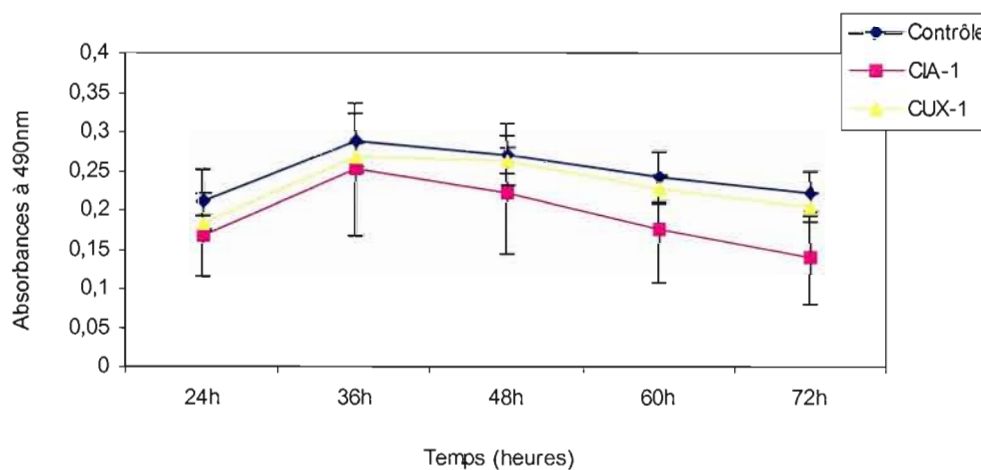


Figure 58: Stimulation blastique des lymphocytes de rate de poussins SPF de 7jrs en culture, non-infectés et infectés avec les virus CIA-1 ou le CUX-1 en absence (A) ou en présence de 30µg/ml de ConA (B).

\*  $p < 0.05$

### **3.6 Effets *in vitro* du CAV sur la sécrétion de cytokines (INF- $\gamma$ et TGF- $\beta$ 1) par les cellules du thymus, de la rate et de la moëlle osseuse.**

Afin de vérifier si la diminution, en présence de ConA, de l'activité métabolique des lymphocytes de rate induite par les virus et non chez les thymocytes s'accompagne de la diminution de la production des cytokines, telles que l'interféron- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), un test ELISA a été réalisé sur des surnageants provenant des thymocytes ou des lymphocytes de rate isolés de poussins SPF d'un et 7 jours d'âge en culture infectés par les virus CAV.

Pour ce faire, les thymocytes de poussins SPF d'un et 7 jrs ont été mis en culture et infectés avec les virus CUX-1 et CIA-1 à un multiplicité d'infection de 0,01 à 0,1 pour une période de 72 heures. Après 72 heures les surnageants ont été récoltés pour analyser leur quantité d'INF- $\gamma$  à l'aide d'un test ELISA. Le même protocole a été réalisé pour les lymphocytes de rate de poussins SPF d'un et 7 jrs, mais les surnageants ont été récoltés à 24 heures d'infection.

Il a été possible d'observer une très faible sécrétion d'INF- $\gamma$  chez les thymocytes de poussins SPF d'un jour comparée à celle des poussins de 7 jrs (Fig. 59). Cependant aucune différence significative n'a été observée chez les thymocytes de poussins SPF d'un jour infectés comparativement aux cellules non-infectées. Les thymocytes non-infectés de poussins de 7 jours produisent plus d'INF- $\gamma$  alors qu'une baisse significative de la sécrétion d'INF- $\gamma$  a été observée chez les thymocytes infectés par la souche CUX-1 seulement ( $P < 0.05$ ) (Fig. 59).

Au contraire, les lymphocytes de la rate de poussins d'un jour produisent une plus grande sécrétion d'INF- $\gamma$  que ceux en provenance de poussins de 7 jours (Fig. 60). L'infection de ces cellules par les deux virus CAV n'a pas modifié significativement la sécrétion d'INF- $\gamma$  par les lymphocytes de rate de poussins d'un

jour. Par contre, chez les lymphocytes de rate de poussins de 7 jours, la sécrétion d'INF- $\gamma$  a eu tendance à baisser en présence de CUX-1, mais pas de manière significative. Cependant, les cellules de moëlle osseuse en présence ou non de virus n'ont pas produit d'INF- $\gamma$  (résultats non-montrés).

D'autre part, la cytokine immunosuppressive TGF- $\beta$  a été analysée, selon la même approche que pour l'INF- $\gamma$ . Les virus CUX-1 et CIA-1 n'altèrent pas la sécrétion de TGF- $\beta$ 1 par les cellules du thymus et de la moëlle osseuse ainsi que des lymphocytes de rate de poussins SPF d'un et 7 jrs (résultats non-montrés), alors que le niveau de sécrétion moyen des cellules non-infectées est de 100 pg/ml.

Donc, tous ces résultats mettent en évidence des effets autant inhibiteurs que stimulateurs de certaines fonctions lymphocytaires et macrophagiques induits par les souches CUX-1 et CIA-1 du virus CAV.

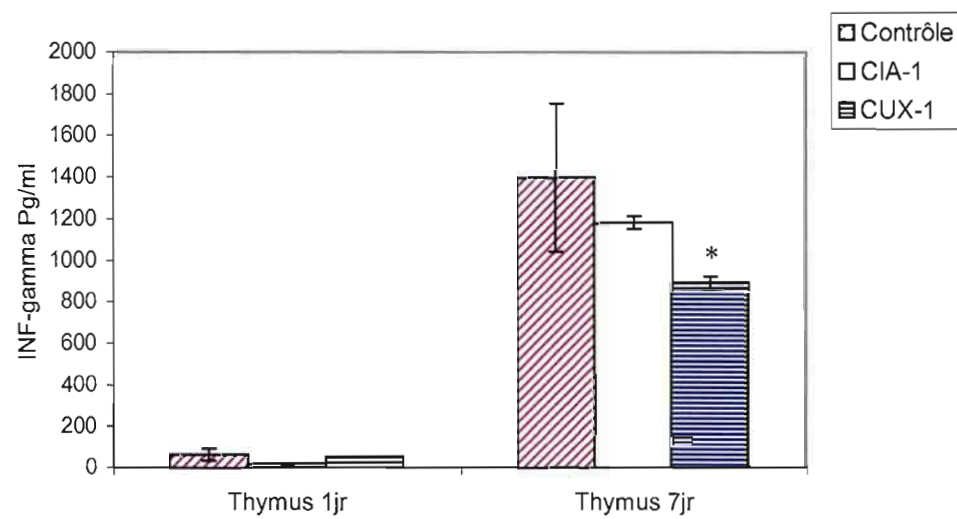


Figure 59: Quantité de l'INF- $\gamma$  aviaire produite par des thymocytes de poussins SPF 1 et 7 jrs après 72heures d'infection avec les virus CIA-1 ou le CUX-1. Expérience réalisée en triplicata.

\*  $p < 0.05$

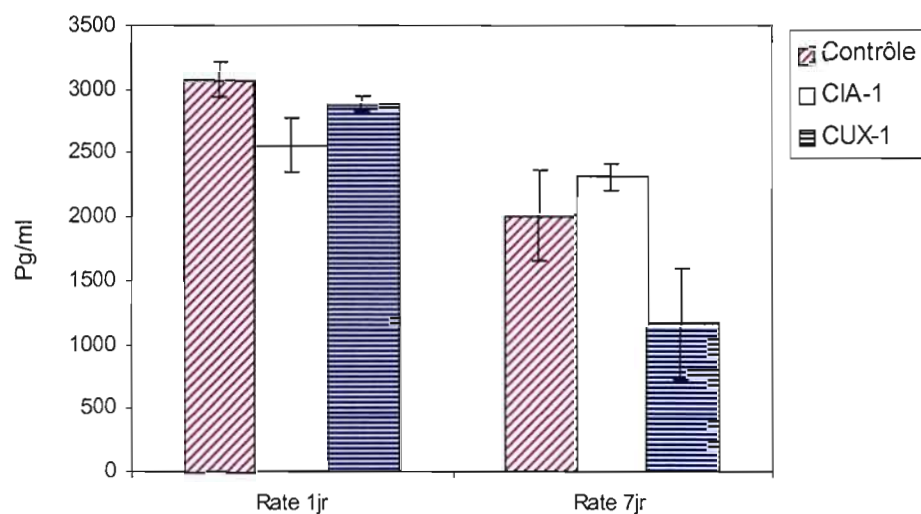


Figure 60: Quantité d'INF- $\gamma$  aviaire produite par des lymphocytes de rate de poussins SPF d'un et 7 jrs après 24 hrs d'infection avec les virus CIA-1 ou le CUX-1. Expérience réalisée en triplicata.



## CHAPITRE 4

### DISCUSSION

Nos travaux ont permis de mettre en évidence les effets des virus CAV directement sur les cellules thymiques et myéloïdes de jeunes poussins. Ainsi, nous avons montré que les virus CAV entraînent *in vitro* l'apoptose précoce des sous-populations thymiques exprimant le marqueur CD8 principalement. Par contre, les cellules NK (CD3-CD8+) ou exprimant le TCR- $\gamma\delta$  ne sont pas affectés par la présence virale. L'apoptose précoce des thymocytes est induite par la replication virale des deux souches de virus, la souche pathogène CUX-1 et la souche atténuée CIA-1, quoique les effets soient plus mitigés avec la souche CIA-1. D'autre part, les deux souches virales peuvent aussi stimuler les thymocytes exprimant le marqueur CD8 principalement lorsque ces cellules proviennent de poussins plus âgés ou commerciaux, mais cette stimulation est aussi associée à une augmentation d'apoptose des cellules en division et à une baisse de la production d'IFN- $\gamma$ . Par contre, le virus CUX-1 a augmenté plus fortement l'apoptose et la phagocytose des macrophages myéloïdes. Ces résultats montrent que les souches de CAV peuvent induire l'apoptose de cellules lymphoïdes *in vitro* des populations TCR- $\alpha\beta$  exprimant principalement le CD8, des macrophages myéloïdes tout en modulant leurs fonctions.

#### 4.1 L'induction d'apoptose lors des infections *in vitro* par les souches CUX-1 et CIA-1 du CAV.

L'infection *in vitro* des cellules thymiques et des cellules adhérentes myéloïdes avec les souches pathogène CUX-1 et atténuée CIA-1 a montré que l'apoptose de ces cellules pouvait être augmentée, tel que démontré par un test TUNEL et par un

double marquage AnnexineV-IP. Le test TUNEL permet d'évaluer le pourcentage de cellules montrant une fragmentation de l'ADN en oligonucléosomes caractéristiques de l'activité endonucléasique sans définir à quel stade de l'apoptose sont rendues les cellules suite à leur contact avec les virus. L'utilisation des marqueurs annexinV et IP permet de distinguer les cellules en apoptose dite précoce ou tardive ainsi que de les différencier des cellules nécrotiques. Nos résultats indiquent que les virus CUX-1 et CIA-1 favorisent une apoptose précoce plutôt que tardive des thymocytes même après 72 hrs d'infection. Cet effet du CAV doit être analysé dans le contexte des différentes étapes du processus d'apoptose. Ainsi, l'apoptose se divise en trois stades dont le premier correspond au signal initial suivi d'une période de latence de longueur variable selon la nature du stimulus initial, la seconde correspond à la phase d'exécution durant laquelle la cellule montre une condensation de la chromatine, et de la vacuolisation cytoplasmique (Teodoro et Branton, 1997). C'est à ce stade que se manifeste la fragmentation caractéristique de la chromatine ce qui correspond à l'apoptose précoce. Finalement, les corps apoptotiques résultant du bourgeonnement de la membrane cytoplasmique contenant des fragments d'ADN se forment et sont phagocytés par les macrophages. Cette dernière étape correspond à l'apoptose tardive et elle s'accompagne d'une diminution du volume cellulaire (Teodoro et Branton, 1997).

Nous avons démontré, chez les thymocytes de poussins SPF de 7 jours ou commerciaux d'un jour, que le test TUNEL mettait peu ou pas en évidence une apoptose accrue chez les cellules infectées, alors que le test Annexin V-IP démontrait clairement une augmentation de l'apoptose précoce et une baisse ou peu d'apoptose tardive des cellules infectées (paramètres FSC/SSC faibles). Les cellules provenant de la région normale (paramètres FSC/SSC élevés) montraient aussi, une augmentation de l'apoptose précoce. Ces résultats indiquent que le virus CAV favorise plutôt une apoptose précoce alors que l'apoptose spontanée des thymocytes non-infectés après 72 hrs est surtout de nature tardive, ce qui suggère que le mécanisme par lequel le

virus induit l'apoptose des cellules diffère en partie des mécanismes d'apoptose normaux du thymus. Il est connu que le virus CAV code pour l'apoptine (VP3) qui induit l'apoptose par un mécanisme différent de celui de l'apoptose des cellules thymiques. L'apoptine induit l'apoptose dans les cellules en division, tel que montré par ses effets pour les cellules transformées ou dérivant de tumeur autant d'origine humaine qu'aviaire (Noteborn 2004; Zhuang *et al.* 1995a; Zhuang *et al.* 1995b; Douglas *et al.* 1995). Ainsi, l'expression de l'apoptine en soi est suffisante pour déclencher l'apoptose (Noteborn *et al.* 1994). Elle se retrouve dans le noyau des cellules en mitose mais lorsque la cellule ne se divise pas, elle se retrouve dans le cytoplasme (Danen-Van Oorschot *et al.* 1997). L'apoptine peut déclencher la cascade des caspases via la caspase-3 même en présence du facteur anti-apoptotique bcl-2 cytoplasmique ou sans passer par la voie pro-apoptotique p53 (Zhuang *et al.* 1995a et b). Il est connu que les thymocytes expriment le facteur anti-apoptotique bcl-2 lors des étapes de division cellulaire et sont alors protégés contre l'apoptose (Murga et Barber 2002). Nos résultats suggèrent que les virus CAV peuvent induire l'apoptose chez des thymocytes en mitose alors que ces mêmes cellules sont protégées par la présence de bcl-2 contre l'apoptose normale thymique, ce qui explique que le CAV peut augmenter le niveau d'apoptose des thymocytes suite à l'infection virale. Les faibles augmentations d'apoptose que nous avons détectées par le test TUNEL mais plus évidente par le test AnnexinV-IP, reflèteraient le fait que les thymocytes mis en culture ne se divisent presque plus, par absence de facteurs de croissance, et que dans une telle situation, l'apoptine virale ne peut induire l'apoptose dans des cellules ne se divisant plus. Ainsi, le niveau d'apoptose spontanée des cellules thymiques restait très élevé dans ces cultures, surtout lorsque les cellules provenaient de poussins SPF d'un jour d'âge. Il a été montré que la survie *in vitro* des thymocytes de poussins d'un jour dépendait de la présence de cellules stromales thymiques et que les cellules attachées à ces cellules stromales pouvaient entrer en apoptose ou être en mitose (Makumoto *et al.* 1999). De plus, peu de cellules en mitose étaient détectées parmi les cellules non-attachées. Aussi, la survie des thymocytes dépend de la production de

cytokines. D'autre part, les travaux réalisés sur le mécanisme d'induction de l'apoptine (Danen-Van Oorschot *et al.* 2000) suggèrent que l'apoptine nécessite en amont la présence de facteurs cellulaires non encore identifiés pour déclencher le processus apoptotique même si elle utilise en aval la voie des caspases.

De plus, l'apoptose induite par le virus CAV diffère de celle de l'apoptose thymique normale par le fait que les cellules infectées par le CAV deviennent apoptotiques après plus de 64 hrs d'infection (Noteborn *et al.* 1994) alors que l'apoptose spontané des thymocytes apparaît plus rapidement (Wyllie *et al.* 1980). Aussi, les résultats de la sensibilité des cellules thymiques et des lymphocyte spléniques stimulées par la ConA *in vitro* ne montrent aucune modification d'activité métabolique en présence du virus, indiquant que l'infection virale demeure latente ou abortive ou qu'elle n'affecte pas les cellules qui ne se divisent pas.

La rate de poussin est également un site où l'on retrouve des pertes de cellules, mais aussi des cellules infectées par le CAV (Noteborn *et Koch* 1995). Cependant, nous n'avons pas pu vérifier l'apoptose chez les poussins SPF d'un jour à cause du trop faible nombre de lymphocytes obtenus par rate puisque ces poussins n'ont pas été préalablement en contact avec des agents vaccinaux ou infectieux ayant favorisé une stimulation des cellules spléniques. Par contre, il a été possible de vérifier par les test TUNEL et Annexin V-IP que, chez les poussins SPF de 7 jours, l'infection par le CAV des lymphocytes de rate n'induisait aucune apoptose. Encore une fois, le fait que les lymphocytes spléniques n'entrent pas en apoptose en présence du virus CAV peut s'expliquer par le fait que les lymphocytes spléniques sont matures et ne se divisent que suite à une stimulation antigénique, ce qui n'est pas le cas des cellules spléniques de poussins SPF. Le virus CUX-1 a même entraîné une augmentation de la stimulation blastique chez ces cellules non-stimulées. Par contre, les cellules spléniques de poussins commerciaux d'un jour, qui proviennent de progénitrices vaccinées, qui sont en plus grand nombre, ont montré un niveau

d'apoptose accru en présence des virus CAV. Contrairement aux cellules thymiques, le niveau d'apoptose des lymphocytes spléniques de ces poussins varie selon la souche virale. Le niveau d'apoptose est plus élevé lorsque les cellules sont en contact avec la souche pathogène CUX-1 qu'avec la souche atténuée CIA-1, suggérant que la pathogénicité de ces souches pourraient être en relation avec leur capacité à induire l'apoptose.

L'infection par le CAV implique l'apoptose des cellules infectées à cause de la protéine VP3 (apoptine) qui est nécessaire au cycle viral (Noteborn et Koch 1995). Les lymphopénies ou atrophies de divers organes lymphoïdes primaires et secondaires déjà observées chez des poussins infectés *in vivo* par le CAV, impliquent non seulement les dérèglements immunomodulateurs, mais aussi la perte de diverses cellules immunes par apoptose (Hu *et al.* 1993; Adair *et al.* 2000; McConnell *et al.* 1993b; Cloud *et al.* 1992a; Jeurissen *et al.* 1992b). Nos résultats *in vitro* suggèrent que la perte des cellules thymiques, spléniques ou myéloïdes serait en partie due à l'effet pro-apoptotique du virus (probablement via la production de VP3) mais aussi qu'il est possible *in vitro* d'étudier le mécanisme par lequel le CAV entraîne la mort de ces cellules. Jusqu'à maintenant, les informations obtenues résultaient de l'infection virale de cellules transformées, cancéreuses ou infectées par le virus de Marek (Noteborn et al., 1994; Danen-Van Oorschot et al., 2000; Zhuang et al., 1995 a et b; Leliveld *et al.* 2003).

Par contre, les cellules adhérentes de la moëlle osseuse en provenance de poussins SPF et mises en culture avec du GM-CSF et de l'IL-7 (afin de favoriser la production de macrophages myéloïdes et/ou de précurseurs lymphoïdes) se sont avérées sensibles à l'apoptose induite par les virus, telle que détectée par les tests TUNEL ou Annexin V-IP. Les cellules myéloïdes en provenance de poussins commerciaux ont aussi montré une sensibilité à l'apoptose induite par la souche CUX-1 surtout. Il est possible que les macrophages de la moëlle osseuse soient une

cible importante pour les virus, car nous savons que la plupart des infections *in vivo* par le CAV causent des pertes visibles de cellules myéloïdes entre le 14 et 21 jours post-infection (Noteborn et Koch 1995; Goryo *et al.* 1985; Otaki *et al.* 1987; Taniguchi *et al.* 1982; Yuasa *et al.* 1979; Yuasa et Imai 1986).

#### **4.2 Les effets de l'infection *in vitro* par le CAV sur les sous-populations cellulaires selon les marqueurs CD4/CD8 dans les organes lymphoïdes de jeunes poussins.**

Les résultats observés sur l'apoptose induite par les souches CUX-1 et CIA-1 du virus CAV sur les populations thymiques suggèrent que certaines sous-populations de lymphocytes seraient des cibles spécifiques aux virus. Il est aussi possible que l'apoptose ne soit pas le mécanisme principal de débalancement immunitaire mais que des arrêts ou des anomalies de maturation des thymocytes soient plutôt induites par le virus.

Nous avons montré que les populations thymiques exprimant le marqueur CD8 étaient affectées par la présence de la souche virulente (CUX-1) et de la souche atténuée (CIA-1) et ce, chez les cellules provenant des trois groupes de poussins (SPF d'un et 7 jours et commerciaux d'un jour). En effet, il a déjà été établi que les cellules du thymus sont affectées lors l'infection *in vivo* de jeunes poussins (Goryo *et al.* 1985; Otaki *et al.* 1987; Taniguchi *et al.* 1982; Yuasa *et al.* 1979; Yuasa et Imai 1986) entraînant généralement l'atrophie du thymus due à la perte des lymphocytes corticaux et médullaires, mais ces effets s'atténuent avec l'âge du poussin (McNulty 1991). Nos travaux ont montré que les sous-populations de thymocytes infectés variaient en fonction de l'âge et du type de poussin d'où provenaient les cellules.

Malgré le fait que le test TUNEL n'a pas permis d'observer une apoptose significative reliée à l'infection *in vitro* par le CAV des thymocytes de poussins SPF

d'un jour, des baisses dans les populations thymiques exprimant les phénotypes CD3-CD4-CD8<sup>low</sup> et CD3-CD4-CD8<sup>high</sup> ont été mises en évidence. Ces observations suggèrent que l'infection virale favoriserait un déséquilibre dans ces sous-populations sans nécessairement entraîner une apoptose significative. Il est aussi possible que la baisse de ces sous-populations résulte de l'apoptose de ces cellules, qui sont en pourcentages relativement faibles dans le thymus, rendant difficile leur détection, ou puisse provenir d'une diminution de l'expression des molécules CD4 et CD8.

Chez les poussins SPF d'un jour, il a été possible d'observer une perte des thymocytes du phénotype CD4-CD8<sup>low</sup> lors de l'infection *in vitro* par les deux souches virales. Ce résultat supporte la théorie d'Adair *et al.* (1993) qui soutient que les cellules exprimant le CD4-CD8<sup>low</sup> sont des cellules cibles du virus. De plus, nous avons constaté une baisse des thymocytes CD3-CD8<sup>low</sup>. Cette sous-population pourrait en fait être la même qu'observée ci-dessus (CD4-CD8<sup>low</sup>). Cette sous-population cible serait alors caractérisée par le phénotype CD3-CD4-CD8<sup>low</sup>, soit celui d'une cellule T immature (ou précurseure), car il a en effet été démontré que les cellules T immatures avant d'acquérir le co-récepteur CD3 à leur surface, doivent passer par un stade où elles co-exprimeraient le CD4 et le CD8 (Paramithiotis *et al.* 1991; Adair *et al.* 1993).

Nous avons aussi constaté une perte des cellules de phénotype CD4-CD8<sup>high</sup> chez les thymocytes de poussins SPF d'un jour infectés *in vitro* par les virus CUX-1. Les cellules CD4-CD8<sup>+</sup> sont des cellules T matures cytotoxiques (Erf *et al.* 1998), mais dans ce cas-ci les cellules affectées peuvent aussi être des cellules T immatures exprimant fortement le CD8 avant d'exprimer le CD4 (Adair *et al.* 1993) ou dont l'expression du marqueur CD4 aurait été bloquée. Il est bien connu que dans le thymus aviaire, il y a expression de thymocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>low</sup> et une importante population co-exprimant les molécules CD4 et CD8 (Luthlala *et al.* 1997 et Luhtala,

1998). Par contre, ces cellules expriment un CD8 $\alpha\alpha$  et non pas un CD8 $\alpha\beta$  car il semble y avoir une exclusion sélective du CD4 par la chaîne  $\beta$  du CD8 et non par la chaîne  $\alpha$ . Les cellules CD4+CD8<sup>high</sup> qui ont été diminuées par l'infection virale seraient des cellules qui expriment une activité cytotoxique (Luhtala *et al.* 1997). En effet, une diminution des cellules T cytotoxiques dans les thymus de poussins infectés *in vivo* a été rapportée, mais à date, cette perte a plutôt été associée à une baisse des cellules T immatures plutôt qu'à l'apoptose des lymphocytes T matures cytotoxiques (Adair *et al.* 1993 et Hu *et al.* 1993b).

Au contraire, ce qui a été observé avec les thymocytes de poussins SPF d'un jour, les thymocytes de poussins commerciaux d'un jour ou SPF de 7 jours ne montrent pas les mêmes modifications dans les sous-populations thymiques. Chez les poussins commerciaux d'un jour, le test d'Annexin V-IP a permis de mettre en évidence une nette augmentation de l'apoptose précoce plutôt qu'avancée chez les thymocytes infectés. En effet, les pourcentages des populations thymiques CD4+CD8<sup>low</sup> et CD4-CD8<sup>low</sup> étaient en baisse alors que les thymocytes CD4+CD8<sup>high</sup> et CD4-CD8<sup>high</sup> étaient augmentés. Ces résultats suggèrent soit une augmentation du processus de maturation thymique ou, au contraire, une diminution des cellules précurseurs entraînant indirectement une augmentation relative des populations thymiques plus matures.

Les différences dans les modifications des sous-populations lymphocytaires suite aux infections virales entre les thymocytes de poussins SPF d'un jour et les poussins commerciaux ou SPF de 7 jours peuvent refléter le fait que les poussins SPF d'un jour possèdent plus de cellules CD4-CD8<sup>low</sup> ou CD4-CD8<sup>high</sup> pouvant correspondre aux cellules précurseurs des CD4+CD8<sup>high</sup> (Adair *et al.* 1993). Les poussins commerciaux proviennent de reproductrices vaccinées et donc mis en contact avec divers types d'antigènes d'où le développement plus rapide des



populations lymphocytaires effectrices (Erf *et al.* 1998). Par contre, étant donné que les populations sont plus matures chez le poussin commercial, il est normal d'observer également une diminution des populations exprimant le  $CD4+CD8^{low}$  correspondant à des cellules T encore immatures. Ainsi, tout comme il a été observé chez le poussin SPF d'un jour, la sous-population  $CD4-CD8^{low}$  qui a diminué suite aux infections virales, représenterait alors aussi une population de lymphocytes T précurseurs.

Toutefois, l'augmentation des populations thymiques de phénotype  $CD4+CD8^{high}$  et  $CD4-CD8^{high}$  pourrait refléter une stimulation de l'expression du marqueur CD8 chez ces cellules. Cette hypothèse a déjà été soulevée par l'équipe de Hu *et al.* (1993b), qui soutiennent que le virus peut interférer avec la présentation de certains antigènes (CD4 et/ou CD8). Il est aussi connu que l'expression de la chaîne  $\beta$  du TCR entraîne un blocage de l'expression du CD4, favorisant ainsi une augmentation des lymphocytes CD8+ cytotoxiques (Luhtala 1998). Cette hypothèse expliquerait la baisse des thymocytes exprimant le  $CD4+CD8^{low}$ , des cellules en voie de devenir  $CD4+CD8^{high}$ , qui aurait été contre-balançée par une augmentation des cellules de phénotype  $CD4+CD8^{high}$ .

D'autre part, la rate aviaire ne contient pas de cellules T précurseurs. Les infections *in vitro* de lymphocytes purifiés de rate ont été très difficiles étant donné le très faible nombre de lymphocytes présents chez les poussins SPF d'un jour. Les expériences concernant les populations de lymphocytes T  $CD4/CD8$  ont donc uniquement été réalisées en duplicata. Une tendance à la baisse des populations  $CD4+CD8^-$  et  $CD4-CD8^{high}$ , soit les lymphocytes auxiliaires et cytotoxiques respectivement, a été remarquée. Toutefois, chez les poussins SPF de 7 jours la quantité plus élevée de lymphocytes T spléniques obtenus a permis de montrer une baisse causée par l'infection par le CAV de la sous-population de lymphocytes de rate

exprimant CD4-CD8<sup>high</sup>, mais aussi une baisse des cellules exprimant le CD3+CD8<sup>high</sup>. Il est fort plausible que la sous-population en baisse dans la rate soit de phénotype CD3+CD4-CD8<sup>high</sup> correspondant aux cellules T cytotoxiques et non pas aux cellules de type NK qui présentent un phénotype CD3-CD8<sup>high</sup>. Ces observations sur les lymphocytes spléniques vont à l'encontre de l'hypothèse de la stimulation de l'expression du CD8 chez les thymocytes suite à l'infection virale. Aussi, nous avons plutôt observé que l'infection *in vitro* par le CAV des thymocytes entraînait une baisse des cellules de phénotype CD4+CD8- et une augmentation des cellules de phénotype CD4+CD8<sup>low</sup> et CD3+CD8<sup>low</sup>. La baisse des cellules CD4+CD8- a déjà été observée chez des thymocytes de poulets infectés *in vivo*. Il a en effet été rapporté des baisses de lymphocytes T CD8+ (cytotoxiques) et CD4+ (auxiliaires) dans la rate de poulets infectés *in vivo* durant 14 et 21 jours (Cloud *et al.* 1992a; Hu *et al.* 1993b). Aussi, les cellules cytotoxiques se sont avérées plus sensibles à l'infection par le CAV (Cloud *et al.* 1992a; Adair *et al.* 1993). La réplication virale a été mise en évidence dans les cellules thymiques exprimant les marqueurs CD8 et CMH-I alors que dans la rate, les cellules exprimant en plus les molécules TCR-2 et CD3 favorisaient la réplication virale indiquant que le virus infecterait les cellules précurseurs dans le thymus mais les cellules matures dans la rate exprimant le CD8 (Adair *et al.* 1993).

Par ailleurs, nous avons aussi observé une augmentation des cellules spléniques exprimant le CD3+CD8<sup>low</sup>. Ceci suggère soit un passage en circulation de lymphocytes encore immatures, tel que déterminé par le faible niveau d'expression du CD8 ou l'induction d'un processus apoptotique des lymphocytes CD8+ matures dans la rate suite à l'infection virale.

D'autre part, la baisse de la population CD4+CD8- et l'augmentation de la population CD4+ CD8<sup>low</sup> observées chez les thymocytes infectés de poussins SPF de 7 jours suggère que l'infection virale favoriserait la maturation puisque la population

CD4+CD8- pourrait être stimulée à exprimer le marqueur CD8. Cette hypothèse n'est pas supportée par les connaissances sur les processus de maturation thymique où les deux marqueurs CD4 et CD8 devraient apparaître simultanément (Luthlala, 1998). Il serait alors plus probable que l'augmentation des cellules CD4+CD8<sup>low</sup> reflète plutôt l'apoptose précoce de cellules CD4+CD8<sup>high</sup>, tel que montré par la baisse des cellules thymiques plus grosses (en division) lors de l'analyse cytofluorométrique. Aussi, la baisse du pourcentage des cellules en apoptose pourrait être liée au fait que le virus prend beaucoup de temps pour se répliquer (Noteborn *et al.* 1992; Phenix *et al.* 1994) et qu'il maintiendrait ces populations en apoptose précoce où la diminution de volume de ces cellules, par la perte des corps apoptotiques, serait ralentie, augmentant ainsi le nombre de cellules dans la région des cellules normales lors d'une analyse FSC/SSC.

Il est proposé que la baisse des lymphocytes exprimant fortement le CD8 ait entraîné une augmentation relative des cellules CD3+CD4+CD8<sup>low</sup>, soit une population de cellules T immatures en train de se différencier en cellules T auxiliaires (en train de perdre l'expression du CD8), type cellulaire impliqué dans la réponse inflammatoire ainsi que dans la présentation d'antigènes (Paramithiotis *et al.* 1991; Adair *et al.* 1993; Bucy *et al.* 1990). Par contre, les études *in vivo* ont montré que les lymphocytes transformés par le virus de Marek permettant la répllication du virus CAV exprimaient les marqueurs des CD4 suggérant que les lymphocytes CD4+ pourraient aussi être des cellules-cibles pour le virus (Adair *et al.* 1993).

#### **4.3 Les effets de l'infection *in vitro* par le CAV sur les sous-populations cellulaires selon les marqueurs TCR dans les organes lymphoïdes de jeunes poussins.**

Les thymocytes exprimant le marqueur CD8 à leur surface appartiennent à plusieurs sous-populations en relation avec la nature du TCR. Il a été possible de

noter que l'infection *in vitro* par le CAV ne cause aucune variation chez les populations exprimant le TCR- $\gamma\delta$  (TCR1) ou même le CD3. Probablement que les cellules exprimant le CD3+TCR- $\gamma\delta$  sont des thymocytes matures, car 60% des cellules de poussins d'un jour expriment le TCR- $\alpha\beta$  (TCR- $\alpha V \beta 1$  : TCR2 ou TCR- $\alpha V \beta 2$  : TCR3), tandis que seulement 10% expriment le TCR- $\gamma\delta$  (Vainio *et al.* 1990; Bucy *et al.* 1990). L'analyse ontogénique des thymocytes aviaires a montré que la maturation se fait par vagues successives de cellules progénitrices qui expriment le TCR- $\gamma\delta$  3 jours plus tôt que le TCR $\alpha\beta$  (Dunon *et al.* 1997). Nos résultats suggèrent alors que la cellule-cible pour le virus est possiblement immature mais dont le niveau de maturation se situe entre l'étape du ré-arrangement du TCR- $\gamma\delta$  et celui du TCR- $\alpha\beta$  ou que la nature du marqueur important pour la permissivité de la cellule au virus n'est pas en relation avec la nature du TCR.

D'autre part, la rate contient également des lymphocytes B qui proviennent de la bourse et servent à la réponse humorale. Ces cellules se caractérisent principalement par l'expression des marqueurs, Ia<sup>+</sup> (CMH de classe II) et IgM<sup>+</sup> (Chen *et al.* 1982; Yasuda *et al.* 2003). Cependant, nous n'avons observé aucune variation des cellules B exprimant l'IgM infectées *in vitro* par le CAV. Par ailleurs, afin de séparer les lymphocytes T et B nous avons fait un marquage TCR- $\gamma\delta$ /IgM et nous avons constaté une augmentation des cellules phénotypées IgM-TCR- $\gamma\delta$ +, suggérant un recrutement des cellules TCR- $\gamma\delta$  ou, plutôt une augmentation relative suite à la diminution des autres populations lymphocytaires spléniques.

#### **4.4 Les effets de l'infection *in vitro* par le CAV sur les cellules myéloïdes en culture.**

Nos résultats ont démontré que l'infection par le CAV sur des cellules de moëlle osseuse de poussins SPF d'un jour ne cause aucune perte des populations des

cellules B, cellules présentatrices d'antigènes ou autres. Les mêmes résultats ont été obtenus chez les poussins SPF de 7 jours, sauf qu'une baisse de la population IgM-CD45+ a été notée. La moëlle osseuse est le lieu de l'hématopoïèse et le CAV devrait infecter les cellules précurseurs (Taniguchi et al. 1982, 1983). Les effets de l'infection virale sur les macrophages myéloïdes se sont aussi manifestés par une augmentation d'apoptose mais aussi par une diminution du marqueur CD45 et une augmentation de la phagocytose de ces cellules. Une grande variété de cellules de la moëlle osseuse, telles que celles appartenant aux lignées myéloïdes et aux cellules présentatrices d'antigènes expriment le récepteur CMH de classe II et le CD45 (Jeurissen *et al.* 2000a), quoique ce dernier marqueur soit aussi présent à la surface de cellules non-immunitaires. La diminution des cellules exprimant le marqueur CD45 et provenant de la moëlle osseuse ne donne pas beaucoup d'informations sur la nature des cellules-cibles myéloïdes. Le double marquage IgM/CD45 a permis de démontrer que les lymphocytes B présents dans la moëlle osseuse (Boyd et Ward 1978; Brand *et al.* 1983) n'étaient pas affectés par le CAV. Quoique les cellules B se retrouvent principalement dans la bourse de Fabricius, durant l'embryogenèse, ils se retrouvent également dans la moëlle osseuse jusqu'à quelques jours après l'éclosion (Houssaint *et al.* 1989). Un très faible pourcentage des ces cellules B précurseurs expriment le IgM et le CD45 à leur surface (Ody *et al.* 1999). Ainsi, les lymphocytes B ne sont pas la population cellulaire qui a été diminuée par l'infection *in vitro* des cellules myéloïdes en culture. Il a déjà été montré lors d'infection *in vivo* que les cellules myéloïdes de poussins de moins de 7 jours qui exprimaient le virus possédaient le CMH-II mais n'appartenaient pas aux lymphocytes (Adair et al. 1993).

L'infection *in vitro* des cellules myéloïdes n'a pas permis de mettre en évidence des changements majeurs autres que ceux cités plus haut. Cette absence d'effet est plutôt surprenante car il est bien connu que l'un des sites majeurs de la replication du virus CAV sont les hémocytoblastes, qui sont des précurseurs érythroblastiques. Il a été démontré que le CAV entraîne la perte des cellules de

moëlle osseuse résultant en une anémie et une baisse des leucocytes en circulation (Taniguchi et al. 1982, 1983). Cela suggère en effet une destruction des progéniteurs des lignées myéloïdes qui donnent habituellement naissance aux monocytes/macrophages. Il a aussi été proposé par Adair (2000) que l'infection lytique des cellules érythroblastiques était responsable de l'anémie observée chez les poussins alors que la destruction des thrombocytes entraînait des problèmes de coagulation. Nos résultats pourraient alors s'expliquer par le fait que cultiver les cellules myéloïdes en présence de GM-CSF et d'IL-7 favorisait la production de cellules de lignée macrophagoérythroïde et des précurseurs des lymphocytes T et B (Iwasaki-Arai *et al.* 2003). Cette explication est aussi supportée par le fait que les cellules obtenues étaient capables de phagocytose, qui est une des caractéristiques des cellules macrophagiques et non pas érythroblastiques. L'apoptose observée dans les cellules myéloïdes provenant seulement de poussins d'un jour suite aux infections virales suggère que ces cellules précurseuses perdent rapidement leur permissivité à l'infection puisque l'apoptose n'était plus détectable chez des cellules en provenance de poussins de 7 jours. Aussi, il est possible de penser que les cellules-cibles myéloïdes pour le virus CAV sont des cellules précurseuses mais seulement à une certaine étape de leur processus de maturation.

#### **4.5 La présence de la VP3 dans les cultures de cellules infectées *in vitro* avec les virus CAV**

D'autre part, afin de vérifier si les effets observés dans les différentes cultures de cellules infectées *in vitro* par les souches de virus pouvaient être reliés à la réplication virale mais surtout à la production d'apoptine (VP3), nous avons effectué l'amplification de l'ADN codant pour l'apoptine par PCR. Ainsi, nous avons remarqué que les échantillons contenant des cellules de thymus, de rate et de moëlle osseuse, ayant été infectées, lavées et ré-incubées, ont donné une réponse positive pour la présence d'ADN viral codant pour l'apoptine. Ces expériences suggèrent que

dans toutes les cultures infectées, la présence d'apoptose peut au moins être due à la production d'apoptine et à la réplication virale. Nous n'avons pas identifié le phénotype de la ou des cellules infectées au cours de ce travail car le but était d'évaluer les modifications dans les populations de cellules immunes suite à la présence de virus quelque soit le mécanisme directement ou indirectement impliqué. Quoique les études antérieures sur la production virale ont été réalisées à partir de poussins infectés ou de cellules transformées, nos résultats montrent qu'il est possible de permettre la réplication virale même dans des cellules normales isolées d'organes lymphoïdes de poussins suite à des infections *in vitro*, tel qu'il a été préalablement montré *in vivo* dans des cellules de thymus, de la moëlle osseuse et de la rate (Soiné *et al.* 1993; McNulty *et al.* 1990; McNeilly *et al.* 1991).

#### **4.6 Le dérèglement de l'immunomodulation par l'infection *in vitro* des cellules d'organes lymphoïdes de poussins par le CAV.**

Ce travail a permis de vérifier si l'infection virale pouvait altérer certaines fonctions immunitaires importantes dans le développement d'une réponse antivirale. Ainsi, au niveau de la présentation d'antigènes, la capacité de phagocytose des cellules myéloïdes a été analysée.

Les expériences réalisées avec les macrophages de moëlle osseuse de poussins commerciaux d'un jour infectés *in vitro* par le CAV ont mis en évidence une activité phagocytaire supérieure à celle des macrophages non-infectés. Ce résultat est surprenant car l'infection *in vivo* par le CAV entraîne une baisse de l'activité phagocytaire chez les macrophages de moëlle osseuse (McConnell *et al.* 1993a). Aussi, ces auteurs ont remarqué que l'infection *in vitro* des macrophages de la moëlle osseuse et de la rate entraînait aussi une baisse de la fonction phagocytaire, de la production d'IL-1 et de l'expression du récepteur Fc. Il est possible que le traitement des cellules myéloïdes par le GM-CSF en présence d'IL-7 ait sensibilisé les

macrophages myéloïdes à une action activatrice reliée à la réplication virale. De plus, la présence d'ADN viraux présents dans la suspension virale aurait pu interagir avec les récepteurs Toll et activer la phagocytose via l'activation du NF- $\kappa$ B (Shiratsuchi *et al.* 2004). D'autre part, McConnell *et al.* (1993) ont vérifié le niveau de phagocytose des macrophages après une période de 48hrs d'infection alors que nous les avons stimulés durant une période plus longue. Aussi, la concentration virale utilisée par ces auteurs était plus élevée que la nôtre.

Cependant, il nous a été possible d'observer que l'ajout de LPS entraînait un effet synergique chez les macrophages infectés, car ils phagocytèrent davantage de billes (2, 3 et plus). Il a déjà été rapporté que l'utilisation du LPS entraîne un effet activateur chez les macrophages (Qureshi *et al.* 1994). Il serait donc possible que l'infection *in vitro* des cellules de moëlle osseuse ait un effet stimulateur sur l'activité phagocytaire des macrophages via les récepteurs Toll comme le fait le LPS. Par contre, cet effet stimulateur n'a été observé qu'avec la souche virulente CUX-1 et non pas la souche CIA-1, suggérant que la souche CIA-1 entraînerait plus d'apoptose diminuant ainsi la phagocytose des cellules myéloïdes ou, au contraire, serait incapable de stimuler les macrophages myéloïdes. Les résultats sur les niveaux d'apoptose observés chez les cellules myéloïdes vont à l'encontre de la première possibilité, suggérant que l'atténuation de la souche CIA-1 pourrait être en relation avec une diminution de stimulation de la phagocytose des macrophages associée à une faible apoptose.

Dans un deuxième temps, nous avons vérifié si les cellules lymphoïdes pouvaient adéquatement répondre à une stimulation en présence des virus. Ainsi, les résultats obtenus par les niveaux de transformation blastique des lymphocytes suite à la stimulation par la ConA ont montré que le virus CUX-1 stimulait légèrement les thymocytes en absence de ConA, mais cet effet était marqué en présence de ConA. Nous avons observé ces effets de réponse blastogénique malgré le fait que les cellules



de thymus, de moëlle osseuse et de rate de poussins de moins de 10-14 jours, sont connues pour ne pas répondre très bien à la stimulation par le ConA (Kilne et Sanders 1980; Cloud *et al.* 1992b). D'ailleurs, les 10 premiers jours après l'éclosion du poussin correspondent à la période où les poussins sont le plus susceptibles à plusieurs agents infectieux (Rosenberg et Cloud 1989b).

Par contre, une réponse blastogénique a été montrée lors d'infections *in vivo* par Cloud *et al.* (1992b) car les lymphocytes du sang périphérique récoltés chez des poussins après 14 jours d'inoculation avec le CAV répondaient très peu à la stimulation par la ConA comparée aux poussins non-inoculés. Cette tendance a également été observée chez la rate jusqu'au 15<sup>e</sup> jour post-inoculation. À partir de ce moment, la capacité des lymphocytes à répondre à la ConA se replaçait graduellement et finalement la transformation blastique devenait supérieure chez les cellules provenant de poussins inoculées par rapport à celles des poussins non-inoculés (Cloud *et al.* 1992b).

Les lymphocytes stimulés peuvent produire des cytokines importantes pour le développement adéquat d'une réponse antivirale cellulaire et humorale. Nous savons que l'IFN- $\gamma$  est principalement produit par les cellules T auxiliaires (Th1), T CD8+ et NK (Jeurissen *et al.* 2000a). Nous avons observé très peu de production d'IFN- $\gamma$  par les thymocytes provenant de poussins SPF d'un jour et les virus CAV n'ont pas ni augmenté, ni diminué cette production. Cependant, chez les cellules de rate de poussins SPF d'un jour, quoique la sécrétion de l'IFN- $\gamma$  ait été plus élevée que celle observée dans le thymus, l'infection par le CAV n'induit aucune variation. Par ailleurs, chez les poussins SPF de 7 jours dont la sécrétion de l'IFN- $\gamma$  était plus élevée que celle observée chez les poussins SPF d'un jour à permis d'observer que l'infection *in vitro* par le CAV des thymocytes après 72 heures a entraîné une baisse de la sécrétion d'IFN- $\gamma$ . Cette diminution de production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes

peut être mise en relation avec la diminution des lymphocytes cytotoxiques puisqu'aucune baisse importante des cellules NK ou des lymphocytes CD4 n'a été observée dans les cellules infectées *in vitro*. Il est fort possible que cette diminution d'IFN- $\gamma$  soit corrélée au manque de réponse des cellules de rate des poussins infectés au CAV à la stimulation par la ConA (Adair *et al.* 1991). Par contre, chez les lymphocytes de rate la sécrétion de l'IFN- $\gamma$  ne semble pas être affectée par l'infection virale, même s'il est possible d'observer une tendance à la baisse de sa sécrétion.

Cette baisse dans la sécrétion de l'IFN- $\gamma$  peut favoriser le développement de l'infection virale dans le thymus, car il a été observé que la production de l'IFN- $\gamma$  par les cellules de rate chez les poussins infectés *in vivo* augmentait jusqu'à 8 jours post-infection, mais qu'elle est ensuite inhibée vers les 15<sup>e</sup>, 22<sup>e</sup> et 29<sup>e</sup> jours post-infection suggérant que l'infection virale pouvait graduellement entraîner la perte des cellules productrices d'IFN- $\gamma$ , favorisant ainsi la persistance du virus (Adair *et al.* 1991).

Le TGF- $\beta$  a une influence immunomodulatrice dans la progression du cycle cellulaire des lymphocytes avec des effets inhibiteurs sur les lymphocytes matures et stimulateurs chez les lymphocytes immatures (Peters *et al.* 2003). Nos résultats montrent que l'infection *in vitro* par le CAV n'a eu aucun effet sur la production du TGF- $\beta$  par les lymphocytes de moëlle osseuse, du thymus ou de la rate. Pourtant, il a été démontré que l'infection *in vivo* par le CAV de poussins, entraînait une destruction des thymocytes CD4+CD8+ et des splénocytes CD8+ et, par conséquent, une baisse de la réponse mitogénique et de la production du TGF- $\beta$  par les splénocytes de poussins de 8 à 15 jours post-infection (Markowski-Grimsurd et Schat 2003).

L'IFN- $\gamma$  et le TGF- $\beta$  jouent un rôle majeur dans la maturation des thymocytes. Le TGF- $\beta$  est une des premières cytokines exprimées par les cellules très immatures

(CD3-) chez l'embryon de 14 jours alors que l'INF- $\gamma$  est produit par les thymocytes embryonnaires de 18 jours jusqu'à 1 jour après l'éclosion (Mukamoto et Kodama 2000; Peters *et al.* 2003). Le fait que seul l'INF- $\gamma$  est affecté par l'infection virale suggère, encore une fois, que les cellules-cibles immatures devraient exprimer le CD3 (qui produit peu de TGF- $\beta$ ) mais assez matures pour produire de l'INF- $\gamma$ .

#### **4.7 Processus pathogéniques des infections avec la souche virulente CUX-1 et la souche atténuée CIA-1.**

L'utilisation de deux souches, l'une étant reconnue comme virulente (CUX-1) et la seconde, comme atténuée (CIA-1) nous permet de mieux identifier les anomalies des cellules immunitaires principalement responsables des aspects pathogéniques de l'infection par le CAV. Nous avons observé que la souche CUX-1 entraîne un peu plus d'apoptose précoce des thymocytes, des lymphocytes spléniques et des cellules myéloïdes que la souche atténuée CIA-1. Aussi, la souche CUX-1 a augmenté plus fortement le niveau de phagocytose des cellules myéloïdes en culture. La souche CIA-1 est un isolat du champ qui se différencie de la souche de référence CUX-1 par son incapacité à se répliquer dans les lignées cellulaires normalement permissives pour les virus. Cet isolat, par contre, se réplique dans les cellules MDCC-MSB1 (Renshaw *et al.* 1996). Il se différencie de la souche CUX-1 par un retard important dans la production de la VP3 (apoptine) et par une diminution dans la production de virus infectieux mais seulement à partir de 5 jours de culture. Cette souche possède des modifications mineures au niveau de l'acide aminé 153 de la VP3 et aussi du C118 de la VP3, affectant ainsi la localisation nucléaire de la VP3. La VP3 de la souche CIA-1 est peu présente dans le noyau et est absente des corps apoptotiques (Renshaw *et al.* 1996). L'analyse de la présence de la VP3 par PCR semble confirmer ces observations, puisque l'intensité des bandes est généralement plus faible dans les cellules infectées avec la souche CIA-1 qu'avec la souche CUX-1 et

ce, pour des niveaux d'infection comparables et pour 72 hrs seulement. Il a été montré que pour une période de 3 jours, la différence de comportement de la souche CIA-1 par rapport à la souche CUX-1 n'est pas encore détectable (Renshaw *et al.* 1996). Par contre, Yamaguchi *et al.* (2001) ont montré que la pathogénicité de souches atténuées de CAV pouvait aussi dépendre de la modification du résidu 394 de la VP1 mais ces auteurs n'ont pas comparé leurs souches atténuées à la souche CIA-1.

L'utilisation de ces deux souches nous a permis de montrer que, malgré que la souche CIA-1 présente une moins grande capacité à induire l'apoptose, les sous-populations lymphocytaires affectées par l'infection demeurent à peu près les mêmes qu'avec la souche CUX-1, suggérant qu'une modification dans l'apoptine peut influencer le niveau de pathogénicité de la souche en diminuant l'apoptose des cellules et, indirectement en diminuant le niveau d'immunosuppression potentielle mais sans affecter la nature de la cellule-cible.

L'infection par le virus CAV *in vivo* de poussins entraîne généralement une forte anémie et lymphopénie causant des dérèglements de l'immunomodulation permettant ainsi les infections secondaires qui finissent la plupart du temps à entraîner la mort du poulet (Adair *et al.* 2000). L'hypothèse soutenue par la plupart des chercheurs est que le CAV cible les cellules précurseurs de la moëlle osseuse et du thymus chez les jeunes poussins empêchant ainsi le développement et la différenciation des cellules des lignées myéloïdes, mais aussi lymphocytaires (Adair *et al.* 2000). En effet, nous avons observé que le virus CAV cible *in vitro* les cellules précurseurs chez les jeunes poussins, particulièrement celles donnant naissance aux cellules T cytotoxiques. Cependant, ces baisses observées pourraient être directement reliées à l'apoptose, car nous avons montré la présence de la réplication virale, une diminution de l'expression du CD8 et une faible réponse blastogénique, suggérant une diminution des thymocytes. Quoique les deux souches de virus aient montré les

mêmes effets mais à des niveaux différents, nous n'avons constaté aucune variation dans la sécrétion du TGF- $\beta$  au contraire de l'IFN- $\gamma$  qui a été diminuée par la souche CUX-1. Les lymphocytes CD8<sup>+</sup> sont nécessaires dans le processus du développement de la réponse cellulaire antivirale car, une fois activés, ils peuvent sécréter de l'IFN- $\gamma$  (Jeurissen *et al.* 2000). Par contre, la baisse de cellules T immatures, mais aussi des cellules T auxiliaires dans le thymus peut aussi entraîner une diminution de la sécrétion de l'IFN- $\gamma$ , tel qu'observé chez les poussins SPF de 7 jours, ce qui porte à croire que cette perte de lymphocytes T auxiliaires aurait aussi un effet sur le développement efficace d'une réponse cellulaire anti-virale.

D'autre part, les poussins SPF de 7 jours sont plus matures et nous avons observé que les cellules immunes y étaient présentes en plus grand nombre que chez les poussins SPF d'un jour. La résistance à l'infection par le CAV augmente avec l'âge du poussin de telle sorte que dès 3 semaines, les poussins ne font plus de signes cliniques (Noteborn et Koch 1995). Ceci est fort probablement dû à une plus grande maturation des cellules de la moëlle osseuse et du thymus qui arrivent à coloniser la rate et les ganglions lymphatiques. Malgré cette résistance, le virus peut persister dans le thymus plusieurs semaines après l'infection mais les mécanismes favorisant cette persistance ne sont pas connus (Noteborn et Koch 1995). Cependant, dans la rate ce sont les lymphocytes T cytotoxiques qui sont affectés par l'infection par le CAV, les mêmes cellules qui sont nécessaires à la détection des cellules infectées exprimant des antigènes viraux à leur surface par le CHM-I (Jeurissen *et al.* 2000).

D'autre part, nous avons montré que les lymphocytes B n'étaient pas affectés par l'infection par les souches de CAV alors qu'*in vivo*, les anticorps anti-CAV apparaissent tardivement lorsque les poussins sont infectés à 1 jour d'âge (2 à 3 semaines) alors que la séroconversion est normale (4 à 7 jours) lorsque les poussins plus âgés sont infectés (Hoop et Reece 1991). Cela suggère que le mécanisme de la

réponse humorale via les lymphocytes CD4<sup>+</sup> auxiliaires serait aussi affecté même si les CD4<sup>+</sup> ne sont pas encore considérés comme une cellule-cible.

Ainsi, les conséquences de l'infection virale et de l'apoptose induite par le virus sur l'efficacité de la réponse immune chez le jeune poussin dépendent autant de la souche virale que de la nature de ou des sous-populations de cellules-cibles lymphoïdes ou myéloblastiques et du niveau de maturité immunologique du poussin.

## CONCLUSIONS

Au cours de ce travail, nous avons tenté de montrer *in vitro* que les effets immunosuppresseurs associés à l'infection par le virus CAV selon les études *in vivo* pouvaient être en partie expliqués par les effets directs de l'infection virale via l'apoptose sur des populations lymphocytaires cibles. Nous avons montré que la différence de pathogénicité de deux souches du CAV était reliée au niveau d'apoptose des cellules myéloïdes en culture et des thymocytes induite par l'infection virale, même sur une période de 3 jours d'incubation seulement. Aussi, nous avons observé que les cellules précurseurs qui étaient les plus affectées par ces virus ne possédaient pas le TCR- $\gamma\delta$  mais exprimaient fortement au moins les marqueurs CD3 et CD8. L'apoptose de ces thymocytes entraînait aussi une expression plus faible de ces marqueurs cellulaires en plus de montrer des caractéristiques cytofluorométriques de cellules apoptotiques. Aussi, des baisses fonctionnelles des thymocytes n'ont pas été clairement mises en évidence. Par contre, les effets suppresseurs des cellules myéloïdes cultivées en présence de GM-CSF ont été plutôt mitigés et, au contraire, une stimulation de la phagocytose a été observée. Nos résultats montrent qu'il est possible maintenant d'étudier les mécanismes viraux responsables de cette suppression lymphocytaire directement *in vitro* même sur une courte période.

Graçe à de nouvelles approches sur la culture de cellules-souches et des facteurs de maturation, il sera possible de mieux identifier la ou les cellules-cibles qui sont responsables du développement des symptômes cliniques et de sélectionner des souches virales montrant un plus faible tropisme pour ces cellules. Aussi, il sera possible, en comprenant mieux le processus de maturation des cellules thymiques et myéloïdes du poussin, de favoriser une maturation plus rapide de ces cellules chez le poussin d'un jour afin de le rendre plus résistant à l'infection. Des travaux plus fondamentaux pourront être continués sur l'approche développée par notre travail afin de modéliser l'infection des thymocytes et des cellules myéloïdes normales en

provenance de poussins de différents âges et conditions et de comprendre les mécanismes par lesquels ce virus induit des désordres cellulaires. Ainsi, nous pourrions être en mesure de mieux sélectionner les souches atténuées qui pourraient servir de vaccins ainsi que de trouver de nouvelles thérapies immunomodulatrices pouvant empêcher l'immunosuppression chez le poussin et réduire les infections secondaires fatales.



## RÉFÉRENCES

- ADAIR, B.M. 2000. Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. *Developmental and Comparative Immunology* **24**: 247-255.
- ADAIR, B.M., McNEILLY, F., McCONNELL, C.D.G., et McNULTY, M.S. 1993. Characterization of surface markers present on cells infected by chicken anemia virus in experimentally infected chickens. *Avian Diseases* **37**: 943-950.
- ADAIR, B.M., McNEILLY, F., CASSIDY, J.P., REILLY, G.A., ADAIR, B., ELLIS, W.A. et McNULTY, M.S. 1995. Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Veterinary Microbiology* **44**: 49-64.
- ADAIR, B.M., McNEILLY, F., McCONNELL, C.D.G., TODD, D., NELSON, R.T. et McNULTY, M.S. 1991. Effects of chicken anemia agent on lymphokine production and lymphocyte transformation in experimentally infected chickens. *Avian Diseases* **35**: 783-792.
- AKIYAMA, Y. et KATO, S. 1974. Two cell lines from lymphomas of Marek's disease. *Biken Journal* **17**: 105-116.
- ALLAN, G.M., McNEILLY, F., KENNEDY, S., DAFT, B., CLARKE, E. G., ELLIS, J.A., HAINES, D.M., MEEHAN, B.M. et ADAIR, B.M. 1998. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **10**: 3-10.
- ARENDS, M.J. et WYLLIE, A.H. 1991. Apoptosis : mechanisms and roles in pathology. *International Review of Experimental Pathology* **32**: 223-254.
- BASSAMI, M.R., YPELAAR, I., BERRYMAN, D., WILCOX, G.E., et RAIDAL, S.R. 2001. Genetic diversity of beak and feather disease virus detected in psittacine species in Australia. *Virology* **279**: 392-400.
- BERCZI, I. 1998. Neurohormonal host defenses in endotoxin shock. *Annals of the New York Academy of Science* **840**: 787-802.
- De BOER, G.F., Van ROOZELAAR, D.J., MOORMAN, R.J., JEURISSEN, S.H.M., Van Der WIJNGAARD, J.C., HILBINK, F. et KOCH, G. 1994. Interaction between chicken anaemia virus and live Newcastle disease vaccine. *Avian Pathology* **23**: 263-275.

- BOMBARA, C.J. et TAYLOR, Jr R.L. 1991. Signal transduction events in chicken interleukin-1 production. *Poultry Science* **70** : 1372-1380.
- BOUNOUS, D.I., GOODWIN, M.A., BROOKS, R.L., LAMICHHANE, C.M., CAMPAGNOLI, R.P., BROWN, J. et SNYDER, D.B. 1995. Immunosuppression and intracellular calcium signaling in splenocytes from chicks infected with chicken anemia virus, CL-1 isolate. *Avian Diseases* **39**: 135-140.
- BOYD, R.L. et WARD, H.A. 1978. Lymphoid antigenic determinants of the chicken. *Immunology* **34**: 9-17.
- BOX, P.G., HOLMES, H.C., BUSHALL, A.C. et FINNEY, P.M. 1988. Impaired response to killed Newcastle disease vaccine in chickens possessing circulating antibody to chicken anemia agent. *Avian Pathology* **17**: 713-723.
- BRAND, A., GALTON, J. et GILMOUR, D.G. 1983. Committed precursors of B and T lymphocytes in chick embryo bursa of Fabricius, thymus, and bone marrow. *European Journal of Immunology* **13**: 449-455.
- BUCY, R.P., CHEN, C.L., CIHAK, J., LOSCH, U. et COOPER, M.D. 1988. Avian T cells expressing gamma delta receptors localize in the splenic and the intestinal epithelium. *Journal of Immunology* **141**: 2200-2205.
- BUCY, R.P., CHEN, C.L. et COOPER, M.D. 1990. Ontogeny of T cell receptors in the chicken thymus. *Journal of Immunology* **144**: 1161-1168.
- Von BÜLOW, V. 1988. Unsatisfactory sensitivity and specificity of indirect immunofluorescence tests for the presence or absence of antibodies to chicken anemia agent (CAA) in sera of SPF and broiler breeder chickens. *Journal of Veterinary Medicine* **B35**: 594-600.
- Von BULÖW, V., SCHAT, K.A. 1997. Chicken infectious anemia. In: Calnek BW, editor. *Diseases of Poultry*. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press. Pp. 739-56.
- BURGESS, A.W., CEBON, J. et SMITH, S. 1989. Haemopoietic growth factor control of normal and neoplastic cellular proliferation. *Biochemical Society Symposia* **55**: 57-68.
- CAMAPANA, D. 1989. The development stages of the human T-cell receptors: a review. *Thymus* **13**: 3-18.

- CARDONA, C.J., WENDELIEN, B.O. et SCHAT, K.A. 2000. Distribution of chicken anaemia virus in the reproductive tissues of specific-pathogen-free chickens. *Journal of General Virology* **81**: 2067-2075.
- CALNEK, B.W., LUCIO-MARTINEZ, B., CARDONA, C., HARRIS, R.W., SCHAT, K.A. et BUSCAGLIA, C. 2000. Comparative susceptibility of Marek's disease cell lines to chicken infectious anemia virus. *Avian Diseases* **44**: 114-124.
- CHAN, M.M., CHEN, C.-L. H., AGER, L.L. et COOPER, M.D. 1988. Identification of avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens. *Journal of Immunology* **140**: 2133-2138.
- CHEN, C.H., AGER, L.L., GARTLAND, G.L. et COOPER, M.D. 1986. Identification of a T3/T-cell receptor complex in chickens. *Journal of Experimental Medicine* **164**: 375-380.
- CHEN, C.-L. H., CIHAK, J., LOSCH, U. et COOPER, M.D. 1988. Differential expression of two T cell receptors. TCR1 and TCR2, on chicken lymphocytes. *European Journal of Immunology* **18**: 539-543.
- CHEN, C.-L. H., BUCY, R.P. et COOPER, M.D. 1990. T cell differentiation in birds. *Seminars in Immunology* **2**: 79.
- CHEN, C.-L. H., LEHMEYER, J.E. et COOPER, M.D. 1982. Evidence for an IgD homologue on chicken lymphocytes. *Journal of Immunology* **129**: 2580-2585.
- CHEN, S.P., WENG, Y.J., TSAI, C.P., CHANG, W.F., LI, N.J., TSAI, C.E. et CHIOU, M.T. 2001. Case report: Identification of pathogenic porcine circovirus in pigs with post-weaning multisystemic wasting syndrome in Taiwan. *Journal of the Chinese Society Veterinary Science* **27**: 251-255.
- CHOI, J., STEVENSON, G.W., KIUPEL, M., HARRACH, B., ANOTHAYANONTHA, L., KANITZ, C.L. et MITTAL, S.K. 2002. Sequence analysis of old and new strains of porcine circovirus associated with congenital tremors in pigs and their comparison with strains involved with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Canadian Journal of Veterinary Research* **66**: 217-224.

- CLAESSENS, J.A.J., SCHRIER, C.C., MOCKETT, A.P.A., JAGT, E.H.J.M. et SONDERMEIJER, P.J.A. 1991. Molecular cloning and sequence analysis of the genome of chicken anemia agent. *Journal of General Virology* **72**:2003-2006.
- CLOUD, S.S., LILLEHOJ, H.S. et ROSENBERG, J.K. 1992a. Immune dysfunction following infection with chicken anemia agent and infectious bursal disease virus. I. Kinetic alterations of avian lymphocyte subpopulations. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **34**: 337-352.
- CLOUD, S.S., LILLEHOJ, H.S. et ROSENBERG, J.K. 1992b. Immune dysfunction following infection with chicken anemia agent and infectious bursal disease virus. II. Alterations of *in vitro* lymphoproliferation and *in vivo* immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **34**: 337-352.
- COOPER, M.D., CHEN, C.-L. H., BUCY, R.P. et THOMPSON, C.R. 1992. Avian T cell ontogeny. *Advances in Immunology* **50**: 87-117.
- CUI, X., LEE, L.F., REED, W.M., KUNG, H.-J. et REDDY, S.M. 2004. Marek's disease virus-encoded vIL-8 gene is involved in early cytolytic infection but dispensable for establishment of latency. *Journal of Virology* **78**: 4753-4760.
- DANEN Van OORSCHOT, A.A.A.M., Van der EB, A.J. et NOTEBORN, M.H.M. 2000. The chicken anemia virus-derived protein apoptin requires activation of caspases for induction of apoptosis in human tumor cells. *Journal of Virology* **74**: 7072-7078.
- DANEN Van OORSCHOT, A.A.A.M., FISCHER, D., GRIMBERGEN, J.M., KLEIN, B., ZHUANG, S.-M., FALKENBURG, J.H.F., BACKENDORF, C., QUAX, P.H.A., Van der EB, A.J. et NOTEBORN, M.H.M. 1997. Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells. *Proceedings of the National Academy of Science* **94**: 5843-5847.
- DIGBY, M.R. et LOWENTHAL, J.W. 1995. Cloning and expression of the chicken interferon-gamma gene. *Journal of Interferon Cytokine Research* **15**: 939-945.
- DINARELLO, C.A., 1998. Interleukine-1, interleukine-1 receptors and interleukine-1 receptor antagonist. *International Reviews of Immunology* **16**: 457-499.
- DOUGLAS, A.J., PHENIX, K., MAWHINNEY, K.A., TODD, D., MACKIE, D.P. et CURRAN, W.L. 1995. Identification of a 24kDa protein expressed by chicken anaemia virus. *Journal of General Virology* **76**: 1557-1562.

- DULAC, G.C. et AFSHAR, A. 1989. Porcine circovirus antigens in PK-15 cell line (ATCC CCL-33) and evidence of antibodies to circovirus in Canadian pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research* **53**:431-433.
- DUNON, D., COURTOIS, D., VAINIO, O., SIX, A., CHEN, C.H., COOPER, M.D., DANGY, J.P. et IMHOF, B.A. 1997. Ontogeny of the immune system :  $\gamma/\delta$  and  $\alpha/\beta$  T cells migrate from thymus to the periphery in alternating waves. *Journal of Experimental Medicine* **186** :977-988.
- ENGSTROM, B.E. et LUTHMAN, M. 1984. Blue wing disease of chickens : signs, pathology and natural transmission. *Avian Pathology* **13**: 1-12.
- ERF, G.F., BOTTJE, W.G. et BERSI, T.K. 1998. CD4, CD8 and TCR defined T-cell subsets in thymus and spleen of 2- and 7-week old commercial broiler chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **62**: 339-348.
- EWERT, D.L., MUNCHUS, M.S., CHEN, C.H. et COOPER, M.D. 1984. Analysis of structural properties and cellular distribution of avian Ia antigen by using monoclonal antibody to monomorphic determinants. *Journal of Immunology* **132**: 2524-2528.
- FAITH, R.E. et CLEM, L.W. 1973. Passive cutaneous anaphylaxis in the chicken. Biological fractionation of the mediating antibody population. *Immunology* **25**: 151-164.
- FARKAS, T., TANAKA, A., KAI, K. et KANO, M. 1996. Cloning and sequencing of the genome of chicken anemia virus (CAV) TK-5803 strain and comparison with other CAV strains. *Journal of Veterinary Medicine and Science* **58**: 681-684.
- FLAD, H.D., KIRCHNER, H. et RESCH, K. 1989. Interleukine-1 and related cytokines. *Lymphokines Research* **8**: 227-233.
- GÖBEL, T.W.F., KASPERS, B. et STANGASSINGER, M. 2001. NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. *International Immunology* **13**: 757-762.
- GORYO, M, SHIBATA, Y., SUWA, T., UMEMURA, T. et ITAKURA, C. 1987. Outbreak of anaemia associated with chicken anaemia agent in young chicks. *Japanese Journal of Veterinary Science* **49**: 867-873.

- GORYO, M., SUGIMURA, H., MATSUMOTO, S., UMEMURA, T. et ITAKURA, C. 1985. Isolation of an agent inducing chicken anaemia. *Avian Pathology* **14**: 483-496.
- GORYO, M., SUWA, T., UMEMURA, T., ITAKURA, C. et YAMASHIRO, S. 1989. Histopathology of chicks inoculated with chicken anaemia agent (MSB1-TK5803 strain). *Avian Pathology* **18**: 73-89.
- GRESHAM, A. JACKSON, G., GILES, N., ALLAN, G., McNEILLY, F. et KENNEDY, S. 2000. PMWS and porcine dermatitis nephropathy syndrome in Great Britain. *Veterinary Record* **146**: 143.
- GROSSI, C.E., LYDYARD, P.M. et COOPER, M.D. 1977. Ontogeny of B cells in the chicken. II. Changing patterns of cytoplasmic IgM expression and modulation requirements for surface IgM by anti- $\mu$  antibodies. *Journal of Immunology* **119** : 749-756.
- GUILLEMOT, F.P., OLIVIER, P.D., PEAULT, B.M. et Le DOUARIN, N.M. 1984. Cells expressing Ia antigens in the avian thymus. *Journal of Experimental Medicine* **160**: 1803-1819.
- GURTU, V., KAIN, S.R. et ZHANG, G. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Analytical Biochemistry* **251**: 98-102.
- HAMEL, A.L., LIN, L.L. et NAYAR, G.P. 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Journal of Virology* **72**: 5262-5267.
- HAYARI, Y., SCHAUENSTEIN, K. et GLOBERSON, A. 1982. Avian lymphokines. II: interleukine-1 activity in supernatants of stimulated adherent splenocytes of chickens. *Developmental and Comparative Immunology* **6**: 785-789.
- HAYNES, B.F., DENNING, S.M., SINGER, K.H. et KURTZBERG, J. 1989. Ontogeny of T-cell precursors: a model for the initial stages of human T-cell development. *Immunology Today* **10**: 87-91.
- HOOP, R.K. et REECE, R.L. 1991. The use of immunofluorescence and immunoperoxidase staining in studying the pathogenesis of chicken anaemia agent in experimentally infected chickens. *Avian Pathology* **20**: 349-355.

- HU, L-B., LUCIO, B. et SCHAT, K.A. 1993a. Abrogation of age related resistance to chicken infectious anemia by embryonal bursectomy. *Avian Diseases* **37**: 157-169.
- HU, L-B., LUCIO, B. et SCHAT, K.A. 1993b. Depletion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocyte subpopulations by CIA-1, a chicken infectious anemia virus. *Avian Diseases* **37**: 492-500.
- IWASAKI-ARAI, J., IWASAKI, H., MIYAMOTO, T., WATANABE, S., et AKASHI, T. 2003. Enforced granulocyte/macrophage colony-stimulating factor signals do not support lymphopoiesis but instruct lymphoid to myelomonocytic lineage conversion. *Journal of Experimental Medicine* **197**: 1311-1322.
- JACOBSON, E.R., CLUBB, S., SIMPSON, C., WALSH, M., LOTHROP, C.D., Jr., GASKIN, J., BAUER, J., HINES, S., KOLLIAS, G.V., POULOS, P. et al. 1986. Feather and beak dystrophy and necrosis in cockatoos: clinicopathologic evaluations. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **189**: 999-1005.
- JACOWLEW, S.B., DILLARD, P.J., SPORN, M.B., ROBERTS, A.B. 1988. Complementary deoxyribonucleic acid cloning of a messenger ribonucleic acid encoding transforming growth factor- $\beta$  4 from chicken embryo chondrocytes. *Molecular Endocrinology* **2**: 1186-1195.
- JACOWLEW, S.B., MATHIAS, A. et LILLEHOJ, H.S. 1997. Transforming growth factor- $\beta$  isoforms in the developing chicken intestine and spleen : increase in transforming growth factor- $\beta$ 4 with coccidia infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **55**: 321-339.
- JEURISSEN, S.H.M., BOONSTRA-BLOM, A.G., AL-GARIB, S.O., HARTOG, L. et KOCH, G. 2000a. Defence mechanisms against viral infection in poultry: A review. *Vet. Quart* **22**: 204-208.
- JEURISSEN, S.H.M., CLAASSEN, E., BOONSTRA-BLOM, A.G., VERVELDE, L. et JANSE, E.M. 2000. Immunocytochemical techniques to investigate the pathogenesis of infectious micro-organisms and the concurrent immune response of the host. *Developmental and Comparative Immunology* **24**: 141-151.

- JEURISSEN, S.H.M., JANSE, ME., Van ROOZELAAR, D.J., KOCH, G. et De BOER, G.F. 1992a. Susceptibility of thymocytes for infection by chicken anaemia virus is related to pre- and post- hatching development. *Developmental Immunology* **2**: 123-129.
- JEURISSEN, S.H.M., POL, J.M.A. et De BOER, G.F. 1989. Transient depletion of cortical thymocytes induced by chicken anaemia agent. *Thymus* **14**: 115-123.
- JEURISSEN, S.H.M., WAGENAAR, F. POL, J.M.A., Van Der EB, A.J. et NOTEBORN, M.H.M. 1992b. Chicken anaemia virus causes apoptosis of thymocytes after *in vivo* infection and of cells lines after *in vitro* infection. *Journal of Virology* **66**: 7383-7388.
- KAISER, P., ROTHWELL, L., GALYOV, E.E., BARROW, P.A., BURNSIDE, J. et WIGLEY, P. 2000. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*. *Microbiology* **146**: 3217-3226.
- KASPERS, B., LILLEHOJ, H.S., JENKINS, M.C. et PHAR, G.T. 1994. Chicken interferon-mediated induction of major histocompatibility complex class II antigens on peripheral blood monocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **44**: 72-84.
- KATO, A., FUJINO, M., NAKAMURA, T., ISHIHAMA, A. et OTAKI, Y. 1995. Gene organization of chicken anemia virus. *Virology* **209**: 480-488.
- KLASING, K.C. 1984. Effect of inflammatory agents and interleukine-1 on iron and zinc metabolism. *American Journal of Physiology* **247**:901-904.
- KLASING, K.C. et JOHNSTONE, B.J. 1991. Monokines in growth and development. *Poultry Science* **70**: 1781-1789.
- KLINE, K. et SANDERS, B.G. 1980. Developmental profile of chicken splenic lymphocyte responsiveness to ConA and PHA and studies on chicken splenic and bone marrow cells capable of inhibiting mitogen-stimulated blastogenic reponses of adult splenic lymphocytes. *Journal of Immunology* **125**: 1792-1797.
- KOCH, G., Van ROOZELAAR, D.J., VERSCHUEREN, C.A.J., Van der EB, A.J. et NOTEBORN, M.H.M. 1995. Immunogenic and protective properties of chicken anaemia virus proteins expressed by baculovirus. *Vaccine* **13**: 763-770.



- KONDAIAH, P. SANDS, M.J., SMITH, J.M., FIELDS, A. ROBERTS, A.B., SPORN, M.B. et MELTON, D.A. 1990. Identification of a novel growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) mRNA in *Xenopus laevis*. *Journal of Biological Chemistry* **265**: 1089-1093.
- LELIVELD, S.R., ZHANG, Y-H., ROHN, J.L., NOTEBORN, M.H.M. et ABRAHAM, P. 2003. Apoptin induces tumor-specific apoptosis as a globular multimer. *Journal of Biological Chemistry* **278** : 9042-9051.
- LESHCHINSKY, T.V. et KLASING, K.C. 2001. Divergence of the inflammatory response in two types of chicken. *Developmental and Comparative Immunology* **25**: 629-638.
- LESLIE, G.A. et CLEM, L.W. 1969. Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken. *Journal of Experimental Medicine* **130**: 1337-1352.
- LEUTZ, A., DAMM, K., STERNECK, E., KOWENZ, E., NESS, S., FRANK, R. *et al.* 1989. Molecular cloning of the chicken myelomonocytic growth factor (cMGF) reveals relationship to interleukin 6 and granulocyte colony stimulating factor. *EMBO Journal* **8**: 175-181.
- LILLEHOJ, H.S., MIN, W., CHOI, K., BABU, U., BURNSIDE, J., MIYAMOTO, T. et LILLEHOJ, E. 2001. Functional characterization of chicken cytokines homologous to mammalian IL-15 and IL-2. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **82**: 229-244.
- LOWENTHAL, J.W., LAMBRECHT, B., Van Den BERG, T.P., ANDREW, M.E., STROM, A.D.G. et BEAN, A.G.D. 2000. Avian cytokines-the natural route approach to therapeutics. *Developmental and Comparative Immunology* **24**: 355-365.
- LUCIO, B., SCHAT, K.A. et SHIVAPRASAD, H.L. 1990. Identification of the chicken anemia agent, reproduction of the disease, and serological survey in the United States. *Avian Diseases* **34**: 707-713.
- LUHTALA, M. 1998. Chicken CD4, CD8 $\alpha\beta$ , and CD8 $\alpha\alpha$  T cell co-receptor molecules. *Poultry Science* **77** :1858-1873.
- LUHTALA, M., LASSILA, O., TOIVANEN, P., et VAINIO, O. 1997. Novel CD4+CD8+ peripheral T cell populations inheritance of CD8 $\alpha$  expression on CD4+ T cells. *European Journal of Immunology* **27** :189-194.

- LYON, J.A. et HINSHAW, V.S. 1993. Inhibition of nitric oxide from avian macrophage cell lines by influenza virus. *Avian Disease* **37**: 868-873.
- MAHE, D., BLANCHARD, P. TRUONG, C., ARNAULD, C., Le CANN, P., CARIOLET, R. MADEC, F., ALBINA, E. et JESTIN, A. 2000. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circovirus and identification of immunorelevant epitopes. *Journal of General Virology* **81**: 1815-1824.
- MANKERTZ, A., MANKERTZ, J., WOLF, K. et BUHK, H.J. 1998. Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus. *Journal of General Virology* **79**: 381-384.
- MARKOWSKI-GRIMSRUD, C.J. et SCHAT, K.A. 2003. Infection with chicken anaemia virus impairs the generation of pathogen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* **109**: 283-294.
- McCONNELL, C.D.G., ADAIR, B.M. et McNULTY, M.S. 1993a. Effects of chicken anemia virus on macrophage function in chickens. *Avian Diseases* **37**: 358-365.
- McCONNELL, C.D.G., ADAIR, B.M. et McNULTY, M.S. 1993b. Effects of chicken anemia virus on cell mediated immune function in chickens exposed to the virus by natural route. *Avian Diseases* **37**: 366-372.
- McILROY, S.G., McNULTY, M.S., BRUCE, D.W., SMYTH, J.A., GOODALL, E.A. et ALCORN, M.J. 1992. Economic effects of clinical chicken anemia agent infection on profitable broiler production. *Avian Diseases* **36**: 566-574.
- McNEILLY, F. ADAIR, B.M. et McNULTY, M.S. 1994. *In vitro* infection of mononuclear cells derived from various chicken lymphoid tissues by chicken anaemia virus. *Avian Pathology* **23**: 547-556.
- McNEILLY, F., ALLAN, G.M., MOFFETT, D.A. et McNULTY, M.S. 1991. Detection of chicken anaemia agent in chickens by immunofluorescence and immunoperoxidase staining. *Avian Pathology* **20**: 125-132.
- McNULTY, M.S. 1991. Chicken anaemia agent: a review. *Avian Pathology* **20**: 187-203.

- McNULTY, M.S., CONNOR, T.J., McNEILLY, F., KIRKPATRICK, K.S. et McFERRAN, J.B. 1988. A serological survey of domestic poultry in the United Kingdom for antibody to chicken anemia agent. *Avian Diseases* **17**: 315-324.
- McNULTY, M.S., CONNOR, T.J. et McNEILLY, F. 1989. A survey of specific pathogen-free chicken flocks for antibodies to chicken anemia agent. *Avian Pathology* **18**: 215-220.
- McNULTY, M.S., MACKIE, D.P., POLLOCK, D.A., McNAIR, J., TODD, D., MAWHINNEY, K.A., CONNOR, T.J. et McNEILLY, F. 1990. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies to chicken anemia agent. *Avian Disease* **34**: 352-358.
- MEEHAN, B.M., TODD, D., CREELAN, J.L., EARLE, J.A.P., HOEY, E.M. et McNULTY, M.S. 1992. Characterization of viral DNAs from cells infected with chicken anaemia agent: sequence analysis of the cloned replicative form and transfection capabilities of cloned genome fragments. *Archives of Virology* **124**: 301-319.
- MEEHAN, B.M., McNEILLY, F., McNAIR, I., WALKER, I., ELLIS, J.A., KRAKOWKA, S. et ALLAN, G.M. 2001. Isolation and characterization of porcine circovirus 2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Archives of Virology* **146**: 835-842.
- MEEHAN, B.M., TODD, D., CREELAN, J.L. CONNOR, T.J. et McNULTY, M.S. 1997. Investigation of the attenuation exhibited by a molecularly cloned chicken anaemia virus isolate by utilizing a chimeric virus approach. *Journal of Virology* **71**: 8362-8367.
- MIYAMOTO, T., LILLEHOJ, H.S., SOHN, E.J. et MIN, W. 2001. Production and characterization of monoclonal antibodies detecting chicken interleukin-2 and the development of an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **80**: 245-257.
- MUKAMOTO, M. et KODAMA, H. 2000. Regulation of early chicken thymocyte proliferation by transforming growth factor- $\beta$  from thymic stromal cells and thymocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **77**: 121-132.
- MUKAMOTO, M., OKADA, T., KODAMA, H., et BABA, T. 1999. Effects of chicken thymic stromal cells on the growth and differentiation of thymocytes in vitro. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **68** : 25-35.

- MURGA, C. et BARBER, D.F. 2002. Molecular of mechanisms pre-T cells receptor-induced survival. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 39156-39162.
- NAWAGITGUL, P., MOROZOV, I., BOLIN, S.R. HARMS, P.A. SORDEN, S.D. et PAUL, P.S. 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *Journal of General Virology* **81**: 2281-2287.
- NIAGRO, F.D., FORSTHOEFEL, A.N., LAWOTHER, R.P., KAMALANATHAN, L., RITCHIE, B.W., LATIMER, K.S. et LUKERT, P.D. 1998. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Archives of Virology* **143**: 1723-1744.
- NICOLA, N.A. 1989. Hemopoietic cell growth factors and their receptors. *Annual Review of Biochemistry* **58**: 45-77.
- NICHOLAS, R.A.J., WESTBURY, B., GODDARD, R.D. et LUFF, P.R. 1989. Survey of vaccines and SPF flocks for contamination with chicken anaemia agent. *Veterinary Record* **124**: 170-171.
- NICOLAS-BOLNET, C., QURESHI, M.A., CIESZYNSKI, J.A. et TAYLOR Jr, R.L. 1995. Avian hematopoiesis in response to avian cytokines. *Poultry Science* **74**: 1970-1976.
- NOTEBORN, M.H.M. 2004 Chicken anemia virus induced apoptosis: underlying molecular mecsnims. *Veterinary Microbiology* **98**: 89-94.
- NOTEBORN, M.H.M., De BOER, G.F., Van ROOZELAR, D.J., KARREMAN, C., KRANENBURG, O., VOS, J.G., JEURISSEN, S.H.M., HOEBEN, R.C., ZANTEMA, A., KOCH, G., Van ORMONDT, H. et Van Der EB, A.J. 1991. Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. *Journal of Virology* **65**: 3131-3139.
- NOTEBORN, M.H.M., KOCH, G. 1995. Chicken anemia virus infection: molecular basis of pathogenicity. *Avian Pathology* **24**: 11-31.
- NOTEBORN, M.H.M., TODD, D., VERSCHUEREN, C.A.J. DeGAUW, H.W.F.M., CURRAN, W.L., VELDKAMP, S., DOUGLAS, A.J., McNULTY, M.S., van der EB, A.J. et KOCH, G.A. 1994. A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *Journal of Virology* **68**: 346-351.

- ODY, C., VAIGOT, P. QUÉRÉ, P., IMHOF, B.A. et CORBEL, C. 1999. Glycoprotein IIb-IIIa is expressed on avian multilineage hematopoietic progenitor cells. *Blood* **93**: 2898-2906.
- ODY, C., CORBEL, C., DUNON, D., VAINIO, O. et IMHOF, B.A. 2000. MHC class II and c-kit expression allows rapid enrichment of T-cell progenitors from total bone marrow cells. *Blood* **96**: 3988-1990.
- OTAKI, Y., NUNOYA, T., TAJIMA, M., KATO, A. et NOMURA, Y. 1988a. Depression of vaccinal immunity to Marek's disease by infection with chicken anemia agent. *Avian Pathology* **17**: 333-347.
- OTAKI, Y., NUNOYA, T., TAJIMA, M., TAMADA, H. et NOMURA, Y. 1987. Isolation of chicken anaemia agent and Marek's disease virus from chicken vaccinated with turkey herpesvirus and lesions induced in chicks by inoculating both agents. *Avian Pathology* **16**: 291-306.
- OTAKI, Y., TAJIMA, M., SAITO, K. et NOMURA, Y. 1988b. Immune response of chicks inoculated with chicken anemia agent alone or in combination with Marek's disease virus or turkey herpesvirus. *Japanese Journal of Veterinary Science* **50**: 1040-1047.
- PARAMITHIOTIS, E., TKALEC, L. et RATCLIFFE, J.H. 1991. High levels of CD45 are coordinately expressed with CD4 and CD8 on avian thymocytes. *Journal of Immunology* **147**: 3710-3717.
- PAPIERNIK, M. et BACH, J.F. 1979. Postnatal development of T cells I. Study of the respective contribution of thymic cellular export, thymic humoral function, and T cell environment. *Journal of Immunology* **123**: 2311-2315.
- PASS, D.A. et PERRY, R.A. 1984, The pathology of psittacine beak and feather disease. *Australian Veterinary Journal* **61**: 69-74.
- PECK, R., MURTHY, K.K. et VAINIO, O. 1982. Expression of B-L (Ia-like) antigens on macrophages from chicken lymphoid organs. *Journal of Immunology* **129**: 4-5.
- PERTILE, T.L., KARACA, K. SHARMA, J.M. et WALSER, M.M. 1996. An antiviral effect of nitric oxide: inhibition of reovirus replication. *Avian Disease* **40**: 342-348.

- PETERS, M.A., BROWNING, G.F., WASHINGTON, E.A., CRABB, B.S. et KAISER, P. 2003. Embryogenic age influences the capacity for cytokine induction in chicken thymocytes. *Immunology* **110**: 358-367.
- PHENIX, K.V., MEEHAN, B.M., TODD, D. et McNULTY, M.S. 1994. Transcriptional analysis and genome expression of chicken anaemia virus. *Journal of General Virology* **75**: 905-909.
- PREMACK, B.A., et GARDNER, P. 1992. Signal transduction by T-cell receptors: mobilization of Ca and regulation of Ca-dependent effector molecules. *American Journal of Physiology* **263**: C1119-C1140.
- QURESHI, M., MARSH, J., DIETERT, R. SUNG, Y., NICOLAS-BOLNET, C. et PETITTE, J. 1994. Profiles of chicken macrophage effector functions. *Poultry Science* **73**: 1027-1034.
- RATCLIFFE, M.J.H., LASSILA, O., PINK, J.R.L. et VAINIO, O. 1986. Avian B cell precursors: surface immunoglobulin expression is an early, possibly bursa-independent event. *European Journal of Immunology* **16**: 129-133.
- RENSHAW, R.W., SOINÉ, C., WEINKLE, T., O'CONNELL, P.H., OHASHI, K., WATSON, S., LUCIO, B., HARRINGTON, S. et SCHAT, K.A. 1996. A hypervariable region VP1 of Chicken Anemia Virus mediates rate of spread and cell tropism in cell culture. *Journal of Virology* **70**: 8872-8878.
- RIETSCHEL, E.T., SCHELTTER, J. WEIDEMANN, B., EL-SAMALOUTI, V., MATTERN, T., ZHRINGER, U., SEYDEL, U., BRADE, H., FLAD, H.D., KUSUMOTO, S., GUPTA, D., DZIARSKI, R. et ULMER, A.J. 1998. Lipopolysaccharide and peptidoglycan: CD14-dependent bacterial inducers of inflammation. *Microbial Drug Resistance* **4**: 37-44.
- RITCHIE, B.W., NIAGRO, F.D., LUKERT, P.D., STEFFENS, W.L., 3<sup>rd</sup>. et LATIMER, K.S. 1989. Characterization of a new virus from cockatoos with pisttaccine beak and feather disease. *Virology* **171**: 83-88.
- ROSELL, C., SEGALÉS, J., RAMOS-VARA, J.A., FOLCH, J.M., RODRIGUEZ-ARRIOJA, G.M., DURAN, C.O., BALASCH, M., PLANA-DURAN, J. et DOMINGO, M. 2000. Identification of porcine circovirus in tissues of pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Veterinary Record* **146**: 40-43.

- ROSENBERG, J.K. et CLOUD, S.S. 1989a. The isolation and characterization of chicken anemia agent (CAA) from broilers in the United States. *Avian Diseases* **33**: 707-713.
- ROSENBERG, J.K. et CLOUD, S.S. 1989b. The effects of age, route of exposure and coinfection with infectious bursal disease virus on the pathogenicity and transmissibility of chicken anemia agent (CAA). *Avian Diseases* **33**: 753-759.
- SHIRATSUCHI, A., WATANABE, I., TAKEUCHI, O., AKIRA, S. et NAKANISHI, Y. 2004. Inhibitory effect of Toll-like receptor 4 on fusion between phagosomes and endosomes/lysosomes in macrophages. *Journal of Immunology* **172**: 2039-2047.
- SIATSKAS, C. et BOYD, R. 2000. Regulation of chicken haemopoiesis by cytokines. *Developmental and Comparative Immunology* **24**: 37-59.
- SMYTH, J.A., MOFFAT, D.A., McNULTY, M.S., TODD, D. et MACKIE, D.A. 1993. A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chicken anemia virus infection at one day of age. *Avian Diseases* **37**: 324-338.
- SOINÉ, C., RENSHAW, R.H., O'CONNELL, P.H., WATSON, S.K., LUCIO, B. et SCHAT, K.A. 1994. Sequence analysis of cell-culture adapted and non-cell culture-adapted strains of chicken infectious anemia virus. *Proceedings of the International Symposium on Infectious Bursal Disease and Infectious Chicken Anaemia*, Rauschholzhausen, Germany: University of Giesen (Pp. 364-365).
- SOINÉ, C., WATSON, S.K., RYBICKI, E., LUCIO, B., NORDGREN, R.M., PARRISH, C.R. et SCHAT, K.A. 1993. Determination of the detection limit of the polymerase chain reaction for chicken anemia virus. *Avian Diseases* **37**: 467-476.
- SONG, K.D., LILLEHOJ, H.S., CHOI, K.D., ZARLENGA, D. et HAN, J.Y. Expression and functional characterization of recombinant chicken interferon-gamma. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **58**: 321-333.
- SOWDER, J.T., CHEN, C.-L. H., AGER, L.L., CHAN, M.M. et COOPER. 1988. A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian  $T\gamma\delta$  receptor. *Journal of Experimental Medicine* **167**: 315-322.

- STEENHUISEN, W., JAGT, H.J.M. et SCHRIER, C.C. 1994. The use of a live attenuated CAV vaccine in breeders flocks in the Netherlands. *Proceedings of the International Symposium on Infectious Bursal Disease and Infectious Chicken Anaemia*, Rauischolzhausen, Germany: University of Giesen (Pp 482-497).
- STUDERT, M.J. 1993. *Circoviridae*: new viruses of pigs, parrots and chickens. *Australian Veterinary Journal* **70**: 121-122.
- TANIGUCHI, T., YUASA, N., MAEDA, M. et HORIUCHI, T. 1982. Hematopathological changes in dead and moribund chicks induced by chicken anemia agent. *National Institute of Animal Health Quarterly* **22**: 61-69.
- TANIGUCHI, T., YUASA, N., MAEDA, M. et HORIUCHI, T. 1983. Chronological observations of hematopathological changes in chicks inoculated with chicken anemia agent. *National Institute of Animal Health Quarterly* **23**: 1-12.
- TAO-WIEDMANN, T.-W., LOOR, F. et HÄGG, L.-B. 1975. Development of surface immunoglobulins in the chicken. *Immunology* **28**: 821-830.
- TEODORO, J.P. et BRANTON, P.E. 1997. Regulation of apoptosis by viral gene products. *Journal of Virology* **71**: 1739-1746.
- THOMAS, W.F.G., KASPERS, B. et STANGASSINGER, M. 2001. NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. *International Immunology* **13**: 757-762.
- TISCHER, I., GELDERBROM, H., VETTERMANN, W. et KOCH, M.A. 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature (London)* **295**: 64-66.
- TISCHER, I., MIELDS, W., WOLFF, D., VAGT, M. et GRIEM, W. 1986. Studies on epidemiology and pathogenicity of porcine circovirus. *Archives Virology* **91**: 271-276.
- TODD, D. 2000. Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathology* **29**: 373-394.
- TODD, D., CREELAN, J.L., MACKIE, D.P., RIXON, F. et McNULTY, M.S. 1990. Purification and biochemical characterization of chicken anaemia agent. *Journal of General Virology* **71**: 819-823.



- TOIVANEN, P. et TOIVANEN, A. 1973. Selective activation of chicken T lymphocytes by concanavalin A. *Journal of Immunology* **111**: 1602-1603.
- VAINIO, O., DUNON, D., AÏSSI, F., DANGY, J.-P., McNAGNY, K.M. et IMHOF, B.A. 1996. HEMCAM, an adhesion molecule expressed by c-kit<sup>+</sup> hemopoietic progenitors. *Journal of Cell Biology* **135**: 1655-16.
- VAINIO, O., LASSILA, O., CIHAK, J., LÖSCH, U. et HOUSSAINT, E. 1990. Tissue distribution and appearance in ontogeny of  $\alpha/\beta$  T cell receptor (TCR2) in chicken. *Cellular Immunology* **125**: 254-260.
- VIELITZ, E. et LANDGRAF, H. 1988. Anaemia-dermatitis of broilers: field observations on its occurrence, transmission and prevention. *Avian Pathology* **17**: 113-120.
- VIELITZ, E. et VOSS, M. 1994. Experience with a commercial CAV-vaccine. *Proceedings of the International Symposium on Infectious Bursal Disease and Infectious Chicken Anaemia*, Rauischolzhausen, Germany: University of Giesen (Pp 465-481).
- WAINBERG, M.A., BEISS, B. et ISRAEL, E. Virus-mediated abrogation of chicken lymphocyte responsiveness to mitogenic stimulus. *Avian Disease* **24**: 580-590.
- WYLLIE, A.H., KERR, J.F.R. et CURRIE, A.R. 1980. Cell death : the significance of apoptosis. *International Review of Cytology* **68**: 251-306.
- XIE, H. RATH, C. HUFF, G.R., HUFF, W.E. et BALOG, J.M.. 2000. Effects of *Salmonella typhirium* lipopolysaccharide on broiler chickens. *Poultry Science* **79**: 33-40.
- YAMAGUCHI, S., IMADA, T., KAJI, N., MASE, M., TSUKAMOTO, K., TANIMURA, N. et YUASA, N. 2001. Identification of a genetic determinant of pathogenicity in chicken anaemia virus. *Journal of General Virology* **82**: 1233-1238.
- YASUDA, M., KAJIWARA, E., EKINO, S., TAURA, Y., HIROTA, Y., HORIUCHI, H., MATSUDA, H. et FURUSAWA, S. 2003. Immunobiology of chicken germinal center: I. Changes in surface Ig class expression in the chicken splenic germinal center after antigenic stimulation. *Developmental and Comparative Immunology* **27**: 159-166.

- YUASA, N. 1983. Propagation and infectivity titration of the Gifu-1 strain of chicken anemia agent in a cell line (MDCC-MSB1) derived from Marek's disease lymphoma. *National Institute of Animal Health Quarterly* **23**: 13-20.
- YUASA, N. et IMAI, K. 1986. Pathogenicity and antigenicity of eleven isolates of chicken anaemia agent (CAA). *Avian Pathology* **15**: 639-645.
- YUASA, N., IMAI, K. et TEZUKA, H. 1985. Survey of antibody against chicken anemia agent (CAA) by an indirect immunofluorescent antibody technique in breeder flocks in Japan. *Avian Pathology* **14**: 521-530.
- YUASA, N., NOGUCHI, T., FURUTA, K. et YOSHIDA, I. 1980. Maternal antibody and its effects on the susceptibility of chicks to chicken anemia agent. *Avian Diseases* **24**: 197-201.
- YUASA, N., TANIGUCHI, T., IMADA, T. et HIHARA, H. 1983a. Distribution of chicken anaemia agent (CAV) and detection of neutralizing antibody in chicks experimentally inoculated with CAA. *National Institute Animal Health Quarterly* **23**: 78-81.
- YUASA, N., TANIGUCHI, T. et YOSHIOLA. 1979. Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks. *Avian Diseases* **23**: 366-385.
- YUASA, N. et YOSHIDA, I. 1983b. Experimental egg transmission of chicken anemia agent. *National Institute Animal Health Quarterly* **23**: 99-100.
- ZHUANG, S.M., SHVARTS, A., Van ORMONDT, H., JOCHEMSEN, A.G., Van der EB, A.J. et NOTEBORN, M.H.M. 1995a. Apoptin, a protein derived from chicken anaemia virus, induces p53-independent apoptosis in human osteosarcoma cells. *Cancer Research* **55**: 486-489.
- ZHUANG, S.M., SHVARTS, A., JOCHEMSEN, A.G., Van OORSCHOT, A.A.A.M., Van der EB, A.J. et NOTEBORN, M.H.M. 1995b. Differential sensitivity to Ad5 E1B-21kD and Bcl-2 proteins of apoptin-induced versus p53-induced apoptosis. *Carcinogenesis* **16**: 2939-2944.